

---

# Über die Etablierung neuartiger Verfahren zur DNA vermittelten *in vitro* Genotyp-Phänotyp-Kopplung

---

Dem Fachbereich Chemie  
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte  
Dissertation

vorgelegt von

Dipl. -Biol. Franziska Loggen  
aus Frankfurt am Main

Referent:	Prof. Dr. Harald Kolmar
Korreferent:	Prof. Dr. Gerhard Thiel
Tag der Einreichung:	26. Mai 2015
Tag der mündlichen Prüfung:	08. Juli 2015

Darmstadt 2015

D17

---



„Am Ende wird alles gut. Wenn es nicht gut ist, ist es noch nicht das Ende“

Oscar Wilde



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Genotyp-Phänotyp-Kopplung.....	1
1.2	<i>In vitro</i> Strategien zur Genotyp-Phänotyp-Kopplung.....	4
1.2.1	<i>In vitro</i> Methoden zur Kopplung von Ribonukleinsäure (RNA) und Polypeptid .....	4
1.2.2	<i>In vitro</i> Methoden zur Kopplung von DNA und Polypeptid: <i>In vitro</i> Kompartimentierung.....	9
1.3	Systeme zur zellfreien Protein Expression .....	18
1.4	HaloTag® Technologie .....	20
1.5	Zielsetzung .....	22
<b>2</b>	<b>Materialien.....</b>	<b>24</b>
2.1	Bakterienstämme .....	24
2.2	Plasmide .....	24
2.2.1	pET22b-sGFP .....	24
2.2.2	pET22b-sGFP-HaloTag-MP/myc .....	25
2.2.3	pET22b-ΔsGFP-HaloTag-MP/myc .....	25
2.3	Oligodesoxyribonukleotide .....	26
2.4	DNA Längenstandards und Protein-Molekulargewichtsmarker .....	26
2.5	Chemikalien.....	27
2.6	Lösungen und Puffer .....	30
2.7	Nährmedien.....	33
2.8	Enzyme, Proteine und Nukleinsäuren.....	34
2.9	Kits .....	34
2.10	Geräte und sonstige Materialien.....	35
<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>38</b>
3.1	Mikrobiologische Arbeitsmethoden .....	38
3.1.1	Vorbehandlung der Geräte und Lösungen .....	38
3.1.2	Kultivierung von Bakterienstämmen .....	38
3.1.3	Lagerung von Bakterienstämmen.....	38
3.1.4	Herstellung elektrisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	38
3.1.5	Transformation von <i>E. coli</i> Zellen mittels Elektroporation .....	39
3.2	Molekularbiologische Arbeitsmethoden.....	39
3.2.1	Extraktion von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	39
3.2.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	39
3.2.3	Elektrophorese von Nukleinsäuren .....	39
3.2.3.1	Elektrophorese von Nukleinsäuren im Agarosegel .....	39
3.2.3.2	Elektrophorese von Nukleinsäuren im Polyacrylamidgel.....	40
3.2.4	Reinigung und Gelextraktion von Nukleinsäuren .....	40
3.2.5	Phenol-Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren .....	41

3.2.6	Fällung der DNA aus wässrigen Lösungen .....	41
3.2.6.1	Fällung der DNA mit Ammoniumacetat und Ethanol .....	41
3.2.6.2	Fällung der DNA mit Natriumacetat und Isopropanol .....	41
3.2.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	41
3.2.7.1	PCR unter Verwendung einer <i>proofreading</i> -Polymerase .....	42
3.2.7.2	Splicing by Overlap Extension PCR (SOE-PCR) .....	43
3.2.7.3	Kolonie-PCR.....	44
3.2.7.4	Einzelmolekül-PCR auf <i>microbeads</i> in Wasser-in-Öl-Emulsion .....	44
3.2.8	Immobilisierung von Biotin markierter PCR-Produkte auf <i>microbeads</i> .....	46
3.2.9	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	46
3.2.10	Ligation von Nukleinsäuren .....	47
3.2.11	Konjugation von Oligonukleotiden mit HaloTag®-Ligand .....	47
3.2.12	Reinigung von Oligonukleotiden .....	47
3.3	Proteinchemische Arbeitsmethoden.....	47
3.3.1	Proteinexpression in <i>E. coli</i> .....	47
3.3.2	Zellaufschluss.....	48
3.3.2.1	Aufschluss von <i>E. coli</i> Zellen mittels Sonifikation .....	48
3.3.2.2	Aufschluss von <i>E. coli</i> Zellen mittels French® Press .....	48
3.3.3	Konzentration von Proteinlösungen mittels Ultrafiltration .....	48
3.3.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	49
3.3.5	Fluoreszenzmessung von sGFP haltigen Lösungen .....	49
3.3.6	Elektrophorese von Proteinen im Polyacrylamidgel.....	49
3.3.7	Coomassie-Färbung von Proteinen im Polyacrylamidgel .....	50
3.3.8	Immunologische Detektion von Proteinen mittels Western- <i>Blot</i> Analyse.....	50
3.3.9	Säulenchromatographische Methoden .....	51
3.3.9.1	Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC) .....	51
3.3.9.2	Anionenaustauschchromatographie .....	51
3.3.10	Dialyse von Proteinlösungen .....	52
3.3.11	Kopplung von Antikörpern auf paramagnetische <i>microbeads</i> .....	52
3.3.12	Nachweis von Antikörpern auf paramagnetischen <i>microbeads</i> .....	52
3.3.13	Immobilisierung von HaloTag Fusionsproteinen.....	53
3.3.13.1	Immobilisierung von HaloTag Fusionsproteinen auf <i>HaloLink™ Magnetic Beads</i> .....	53
3.3.13.2	Immobilisierung von HaloTag Fusionsproteinen auf paramagnetische <i>microbeads</i> .....	53
3.4	Zellfreies Proteinexpressionssystem.....	53
3.4.1	Herstellung von <i>E. coli</i> S30 Extrakt .....	53
3.4.2	Herstellung von T7 RNA-Polymerase .....	54
3.4.3	Zellfreie Proteinexpression.....	55
3.4.4	Zellfreie Proteinexpression in Wasser-in-Öl Emulsion .....	55
3.4.5	Selektion von DNA-Protein-Komplexen .....	56
3.4.6	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay auf microbeads (Bead-ELISA)</i> .....	56
4	<b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>58</b>
4.1	Etablierung eines zellfreien Systems zur Expression von HaloTag Fusionsproteinen .....	58
4.1.1	Zellfreie Proteinexpression von sGFP .....	59
4.1.2	Zellfreie Proteinexpression in Wasser-in-Öl-Emulsion .....	60
4.1.3	Expression und Nachweis von funktionellem sGFP-HaloTag-Fusionsprotein im zellfreien System	61
4.1.4	Diskussion .....	62
4.2	HaloTag <i>microbead display</i> .....	63



---

4.2.1	Einzelmolekül PCR auf <i>microbeads</i> in Wasser-in-Öl-Emulsion .....	64
4.2.2	Zellfreie Proteinexpression auf <i>microbeads</i> .....	69
4.2.3	Co-Immobilisierung von Matrizen-DNA und Proteinprodukten .....	70
4.2.4	Diskussion .....	73
4.3	HaloTag-DNA-display .....	75
4.3.1	Generierung modifizierter Oligonukleotide .....	77
4.3.2	Herstellung geeigneter Matrizen-DNA für das HaloTag-DNA- <i>display</i> .....	78
4.3.3	Nachweis der Bildung von DNA-Protein-Komplexen.....	79
4.3.4	Nachweis der Genotyp-Phänotyp-Kopplung im HaloTag-DNA- <i>display</i> .....	82
4.3.5	Diskussion .....	85
4.4	Selektion einer randomisierten Peptidbibliothek mittels HaloTag-DNA-display .....	86
4.4.1	Generierung einer randomisierten Peptidbibliothek .....	87
4.4.2	Selektion der HaloTag-MP-Bibliothek auf Bindung des anti-myc Antikörpers .....	88
4.4.3	Analyse der auf anti-myc-Antikörper Bindung selektierten HaloTag-Bib-Varianten .....	89
4.4.4	Selektion und Analyse der HaloTag-MP-Bibliothek auf Bindung des anti-Sendai- Antikörpers .....	92
4.4.5	Diskussion .....	96
5	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>100</b>
6	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>108</b>
7	<b>Danksagung.....</b>	<b>111</b>
8	<b>Erklärungen.....</b>	<b>112</b>
8.1	Erklärung.....	112
8.2	Erklärung.....	112
9	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>113</b>

---

## 1 Einleitung

---

Die Bedeutung der Evolution wurde 1859 erstmals von Charles Darwin in seinem Buch „*On the Origin of Species by means of Natural Selection*“ dargestellt (Darwin, 1859). Dieser Theorie liegt die heute allgemein anerkannte Annahme zu Grunde, dass alle lebenden Zellen primär durch aufeinanderfolgende Runden von Veränderung, Selektion und Amplifikation evolutiv entstanden sind. Dies basiert auf dem Prinzip, dass der Organismus mit der besten Fitness (der die höchste Wachstumsrate aufweist) unter festgelegten Bedingungen die anderen Organismen in einer Population überlebt und auskonkurriert. Unter Anwendung von modernen molekularbiologischen Methoden ist es nun möglich, diesen Prozess auf molekularer Ebene zu imitieren, um gezielt Moleküle mit ausgewählten Eigenschaften zu entwickeln. Hierfür wird eine große Anzahl unterschiedlicher Varianten, eine sogenannte Bibliothek, erstellt und im Anschluss werden Varianten mit einer gewünschten Eigenschaft selektiert.

Für diesen Prozess der gerichteten Evolution können sowohl Nukleinsäuren als auch Proteine als Zielmolekül herangezogen werden (Tuerk & Gold, 1990, Ellington & Szostak, 1990, Jäckel *et al.*, 2008). Bei Nukleinsäuren ist der replikationsfähige Genotyp mit der hierin kodierten Eigenschaft, dem Phänotyp, identisch. Im Gegensatz hierzu sind Proteine in sich selbst nicht replikationsfähig, was eine physikalische Verknüpfung des Proteins mit der dieses Protein kodierenden Nukleinsäure erforderlich macht.

### 1.1 Genotyp-Phänotyp-Kopplung

Als Genotyp-Phänotyp-Kopplung wird die physikalische Verknüpfung einer replikationsfähigen Nukleinsäure (Genotyp) mit der durch diese Nukleinsäure kodierten Eigenschaft (Phänotyp) bezeichnet (Braun & Paschke, 2006). In der Natur wird diese Genotyp-Phänotyp-Kopplung durch den Einschluss von Genen in Zellen gewährleistet. Für die gerichtete Evolution von Proteinen existiert eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden, um diese Verknüpfung von Genotyp und Phänotyp zu erzielen. Einigen dieser Methoden basieren auf zellulären Systemen, welche sowohl die genetische Information als auch das Zielprotein in sich vereinen, und gleichzeitig die Maschinerie zur Expression dieser Zielproteine bereitstellen. Andere verwenden eine direkte physikalische Verknüpfung von genetischem Material und Proteinprodukt, wie dies zum Beispiel in der Natur bei Viren der Fall ist. Hierbei stellen die viralen Hüllproteine den

Phänotyp dar, dessen genetische Information sich auf dem viralen Genom im Inneren des Virion befindet.

Eine Möglichkeit zur Genotyp-Phänotyp-Kopplung ist die Oberflächenpräsentation auf Bakterienzellen, welche auch als *bacterial surface display* bezeichnet wird (Becker *et al.*, 2004; van Bloois *et al.*, 2011). Das Zielprotein wird hierbei in Fusion mit einem Translokatorprotein exprimiert, welches auf der Außenseite der Bakterienzelle lokalisiert und fest in der Zellwand verankert ist (Abbildung 1.1 A). Hierzu wurde eine Vielzahl von unterschiedlichen Verfahren beschrieben, welche sowohl Gram-negative als auch Gram-positive Bakterien sowie verschiedenste Translokatorproteine zur Oberflächenpräsentation verwenden (Lee *et al.*, 2003; Löfblom, 2011).

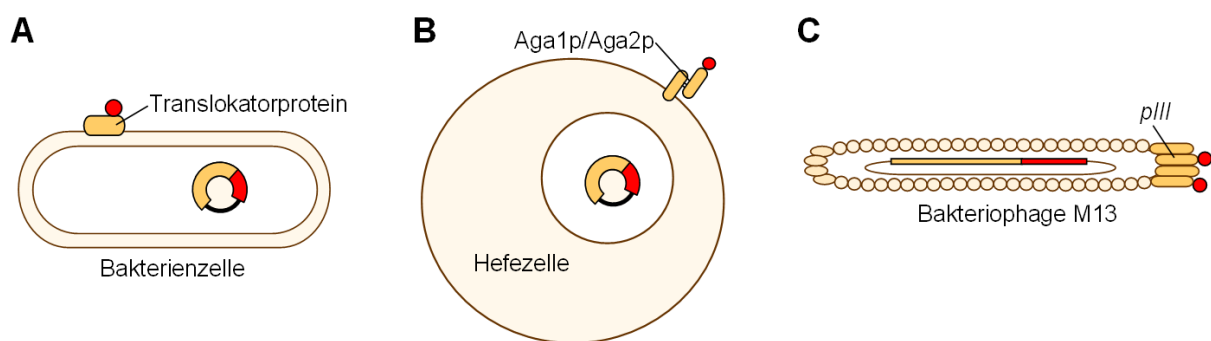


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung von *in vivo* Strategien zur Genotyp-Phänotyp-Kopplung. Genotyp und Phänotyp sind jeweils in rot dargestellt. A) Oberflächenpräsentation des Zielproteins in Fusion mit einem Translokatorprotein auf einer Bakterienzelle (*bacterial surface display*). Das Gen für das Fusionsprotein liegt plasmidkodiert im Zytoplasma vor. B) Oberflächenpräsentation des Zielproteins in Fusion mit Aga2p über Aga1p auf einer Hefezelle (*yeast surface display*). Das Gen für das Fusionsprotein liegt plasmidkodiert im Zellkern vor. C) Oberflächenpräsentation des Zielproteins in Fusion mit pIII auf einem Bakteriophagen (*phage display*). Das Gen für das Fusionsprotein liegt plasmidkodiert im Inneren des Virion vor.

Ein eukaryotisches System zur Zelloberflächenpräsentation stellt das *yeast surface display* dar (Boder & Wittrup, 1997). Hierbei wird das Zielprotein expremiert und in Fusion mit einem Ankerprotein auf der Oberfläche von Hefezellen präsentiert (Abbildung 1.2 B). Das gängigste System zur Oberflächenpräsentation auf Hefezellen verwendet den Stamm *Saccharomyces cerevisiae*, wobei die beiden Untereinheiten Aga1p und Aga2p des alpha-Agglutinin die Kopplung des Zielproteins vermitteln. Im Gegensatz zur Oberflächenpräsentation auf Bakterien erlaubt die sekretorische Biosynthese der Hefe sowohl die Ausbildung von Disulfidbrücken, eine Glykosylierung des Zielproteins als auch die Präsentation von oligomeren Proteinen auf der Zelloberfläche (Gai & Wittrup, 2007, Traxlmayr *et al.*, 2012, Gera *et al.*, 2013).

Eine der ältesten und die am weitesten verbreitete Methode zum Durchmustern von kombinatorischen Proteinbibliotheken ist das 1985 von George Smith eingeführte *phage display*

---

(Smith, 1985). Bei dem am häufigsten verwendeten Verfahren wird das Zielprotein in Fusion mit dem Hüllprotein *pIII* auf der Oberfläche des filamentösen *Escherichia coli* (*E. coli*) Phagen M13 präsentiert (Abbildung 1.1 C). Auch die Strukturproteine *pVIII* und *pVI* wurden bereits erfolgreich zur Präsentation verwendet (Rodi & Makowski, 1999). Weitere Verfahren wurden beschrieben, bei denen das Zielprotein unter anderem auf den Bakteriophagen f1, fd, T4, T7 oder Lambda präsentiert wird (Smith & Petrenko, 1997, Santini *et al.*, 1998, Ren & Black, 1998, Gamkrelidze & Dabrowska, 2014).

Obwohl Bakteriophagen keine Organismen im eigentlichen Sinne darstellen, zählt das *phage display* zu den *in vivo* Methoden der Genotyp-Phänotyp-Kopplung. Zur Expression der Proteine im *phage display* sind Zellen erforderlich, obgleich die Selektion unter *in vitro* Bedingungen stattfindet. Ebenso ist hier, genau wie bei der Zelloberflächenpräsentation auf Bakterien oder Hefen, eine Transformation von Zellen mit einer plasmidkodierte Bibliothek erforderlich. Der Prozess der Transformation ist vergleichsweise aufwändig sowie zeitintensiv, was die Anzahl der Varianten einer Bibliothek in Abhängigkeit von der Transformationseffizienz limitiert. Die praktikable Obergrenze einer *in vivo* Bibliothek liegt schätzungsweise bei etwa  $10^{10}$  Varianten, wobei bereits Phagenbibliotheken für den Einsatz in der pharmazeutischen Industrie in einer Größenordnung von  $10^{12}$  in der Literatur beschrieben wurden (Sidhu *et al.*, 2000). Im Anschluss an die Transformation muss das Zielprotein von dem jeweiligen Mikroorganismus exprimiert und auf der Oberfläche präsentiert werden. Hierbei können Wachstumsnachteile, wie etwa Toxizität des Zielproteins oder eine schlechte Präsentierbarkeit, beispielsweise aufgrund der Faltungsstruktur, die Diversität der Bibliothek weiter verringern. Gleichzeitig kann es geschehen, dass einzelne Mitglieder den Selektionsdruck umgehen und somit überrepräsentiert vorliegen. Durch die Lokalisation des Genotyps im Zellinneren gestaltet sich eine weitere Veränderung des Phänotyps während der Selektion als schwierig, da dieser hierfür zunächst isoliert, dann mutiert und anschließend erneut in die Zellen eingebracht werden müsste. Zusätzlich müssen die Selektionsbedingungen so gewählt werden, dass sie das Überleben der Organismen bzw. die Infektiosität der Phagen gewährleisten, wodurch sie sich nicht zu stark vom zellulären Milieu unterscheiden können.

Diese Limitationen könnten durch zellfreie Systeme zur Genotyp-Phänotyp-Kopplung überwunden werden. Der Hauptvorteil der *in vitro* Methoden ist darin begründet, dass der Transformation- und Klonierungsschritt entfällt, wodurch deutlich größere Bibliotheken (mit

---

weit über  $10^{15}$  Varianten) generiert werden können (Leemhuis *et al.*, 2005). Gleichzeitig besteht die Möglichkeit, die Selektion beispielsweise bei extremen Temperatur-, pH- oder anderen nichtphysiologischen Bedingungen durchzuführen. Hierfür ist eine Genotyp-Phänotyp-Kopplung notwendig, die robust genug ist diesen Selektionsbedingungen standzuhalten, da nur solche Proteine amplifiziert werden können, die an ihre eigenen kodierenden Nukleinsäuren gebunden sind.

## 1.2 *In vitro* Strategien zur Genotyp-Phänotyp-Kopplung

Bei allen oben beschriebenen *in vivo* Methoden wird die Kopplung von Genotyp und Phänotyp durch Kompartimentierung von Genen in Zellen bzw. Virionen vermittelt. Diese Kompartimentierung wird von *in vitro* Methoden umgangen, was eine andersartige physikalische Verknüpfung von Protein und Nukleinsäure erforderlich macht. In den letzten zwei Jahrzehnten wurde eine Reihe von Methoden entwickelt, die eine solche Verknüpfung gewährleisten und sich voneinander teilweise stark unterscheiden. Im folgenden Abschnitt werden einige der bisher in der Literatur beschriebenen *in vitro* Strategien zur Kopplung von Genotyp und Phänotyp näher erläutert.

### 1.2.1 *In vitro* Methoden zur Kopplung von Ribonukleinsäure (RNA) und Polypeptid

Als erstes *in vitro* Verfahren zur Genotyp-Phänotyp-Kopplung wurde das *ribosome display* 1994 von Mattheakis *et al.* zur Selektion von Peptiden entwickelt (Mattheakis *et al.*, 1994). Diese Methode wurde in den kommenden Jahren weiter verfeinert, um auch größere, vollständig gefaltete Proteine präsentieren und selektieren zu können (Hanes & Plückthun, 1997, He & Taussing, 1997). Das *ribosome display* basiert auf der Bildung von nicht-kovalenten Polysom-Komplexen aus *messenger* RNA (mRNA), Ribosom und der neuentstehenden Polypeptidkette, wodurch die Kopplung von Genotyp und Phänotyp vermittelt wird. Die Bildung dieser Protein-Ribosom-mRNA-Komplexe (PRM-Komplexe) wird durch das Fehlen eines Stoppcodons auf dem mRNA Transkript erzielt (Plückthun, 2012).

Der Prozess der Translation endet normalerweise wenn ein Stoppcodon in die A-Stelle des Ribosoms eintritt. Hierbei wird das Stoppcodon der mRNA durch die Terminationsfaktoren der Klasse I (*class-I peptide release factors*) erkannt, welche gleichzeitig die Freisetzung der Polypeptidkette vom Ribosom durch Hydrolyse der Peptidyltransfer-RNA (Peptidyl-tRNA) in

---

der P-Stelle vermitteln (Klaholz, 2011). Im Anschluss wird die Dissoziation der ribosomalen Untereinheiten und die Freisetzung des mRNA Moleküls durch Ribosomrecyclingfaktoren herbeigeführt (Hirokawa *et al.*, 2006).

Ist kein Stoppcodon auf dem mRNA Transkript enthalten, so läuft das Ribosom bis zum 3' Ende des mRNA Moleküls vor. Die Bindung der Terminationsfaktoren, die Freisetzung der Polypeptidkette sowie die Dissoziation des ribosomalen Komplexes können in diesem Fall nicht stattfinden. Das C-terminale Ende der Polypeptidkette befindet sich hierbei noch im ribosomalen Ausgangstunnel und bleibt mit der letzten Peptidyl-tRNA verbunden, wodurch das Protein in dieser Position arretiert wird. Durch die Codon-Anticodon-Wechselwirkung zwischen der Peptidyl-tRNA in der P-Stelle und dem 3' Ende der mRNA wird die Freigabe des mRNA Moleküls verhindert und es kommt somit zur Ausbildung eines PRM-Komplexes. Im Anschluss an die *in vitro* Expression können die hierbei entstandenen PRM-Komplexe zur Selektion auf Bindung eines immobilisierten Zielmoleküls eingesetzt werden. Die Zugabe von Ethylendiamintetraacetat (EDTA) bewirkt die Dissoziation des ribosomalen Komplexes, wodurch das mRNA Molekül nun frei vorliegt. Dieses kann durch reverse Transkription in *complementary* Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben und anschließend durch Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert werden, wonach es als Matrize zum Einsatz für eine weitere Selektionsrunde zur Verfügung steht (Hanes & Plückthun, 1997). Die einzelnen Schritte des *ribosome display* sind in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt.

Für eine erfolgreiche Selektion sind stabile PRM-Komplexe erforderlich. Daher muss eine spontane Hydrolyse der Esterbindung zwischen Polypeptid und tRNA oder eine spontane Dissoziation des ribosomalen Komplexes verhindert werden. Dies wird normalerweise durch kurze Translationszeiten, niedrige Temperaturen und hohe Magnesiumionen-Konzentrationen erreicht. Kurze Translationszeiten stellen hierbei einen Kompromiss zwischen effizienter Translation und Degradation der mRNA durch die im Translationsextrakt enthaltenen Ribonukleasen (RNasen) dar (Plückthun, 2012).

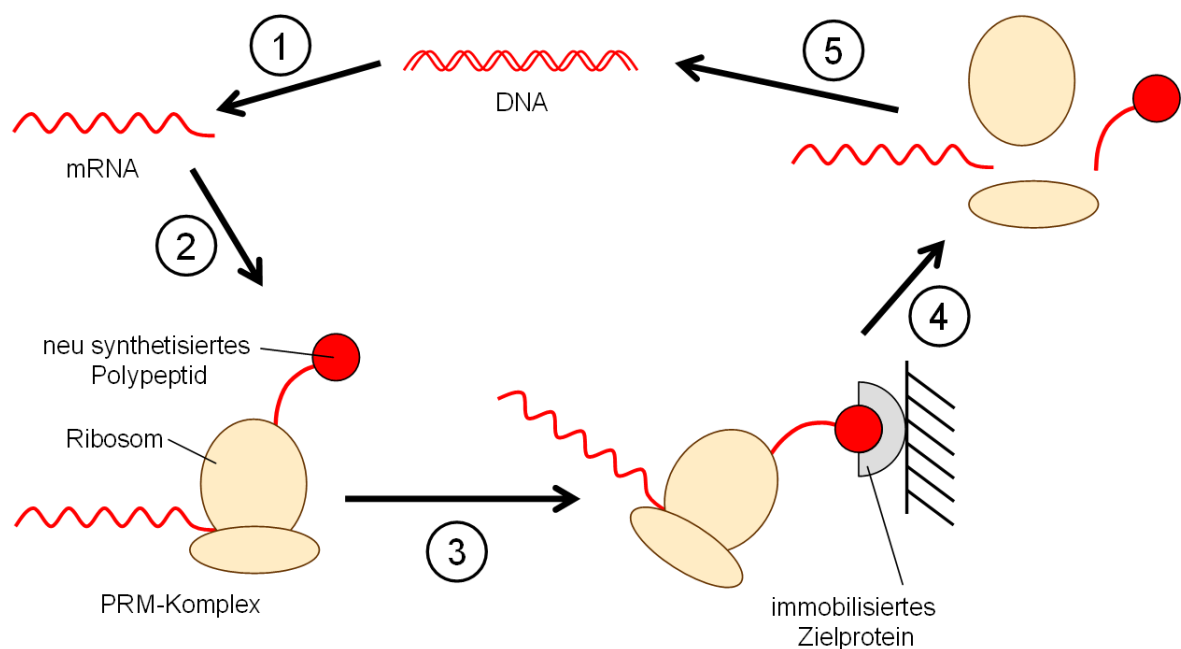


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung einer Selektionsrunde des ribosome displays.

1) Die für das ribosome display eingesetzte Matrizen-DNA wird durch in vitro Transkription in Stoppcodon-freie mRNA umgeschrieben. 2) Die neu synthetisierte mRNA wird in vitro translatiert, wobei es am 3' Ende der mRNA Moleküle zum ribosomalen Arrest und der Bildung von stabilen PRM-Komplexen kommt. 3) Die PRM-Komplexe werden zur Selektion auf Bindung eines immobilisierten Zielmoleküls eingesetzt. Nichtbindende PRM-Komplexe werden durch Waschen entfernt. 4) Durch Zugabe von EDTA werden die PRM-Komplexe aufgelöst, und die nun frei vorliegenden mRNA Moleküle durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels PCR amplifiziert. Hiernach stehen die PCR Produkte zum Einsatz als Matrizen-DNA für eine weitere Selektionsrunde bereit.

Neben randomisierten Peptiden werden vor allem Bibliotheken von *single-chain* Antikörperfragmenten (Hanes *et al.*, 1998, Hanes *et al.*, 2000, Zhao *et al.*, 2013, Bencurova *et al.*, 2015) und *Designed Ankyrin Repeat Proteins* (DARPs) (Binz *et al.*, 2003, Kummer *et al.*, 2012, Schilling *et al.*, 2014) zur Selektion und Affinitätsmaturierung im *ribosome display* eingesetzt. Aber auch die Selektion von Bibliotheken basierend unter anderem auf cameliden VHH Domänen (Yau *et al.*, 2005, Perruchini *et al.*, 2009), Lectinen (Yabe *et al.*, 2007, Hu *et al.*, 2014), Enzymen wie Proteasen (Quinn *et al.*, 2008) oder Reversen Transkriptasen (Baranauskas *et al.*, 2012, Skirgaila *et al.*, 2013) wurden bisher beschrieben.

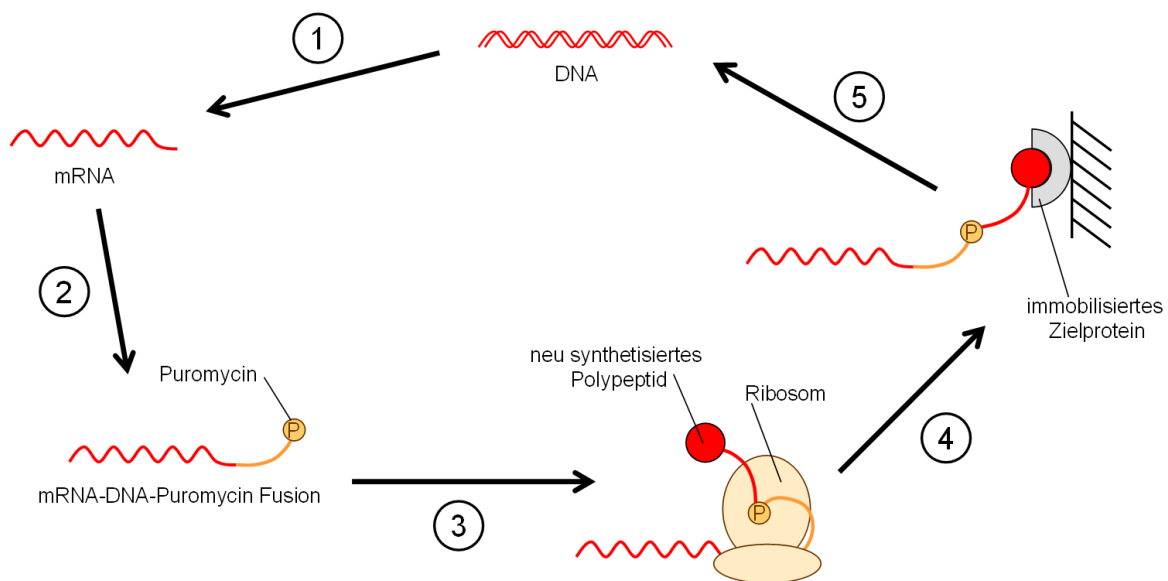


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung einer Selektionsrunde des *mRNA displays*.

1) Die für das *mRNA display* eingesetzte Matrizen-DNA wird durch *in vitro* Transkription in mRNA umgeschrieben. 2) An die neu synthetisierten mRNA-Moleküle wird ein 3'-Puromycin-modifiziertes DNA-Oligonukleotid ligiert. 3) Die modifizierten mRNA-Moleküle werden *in vitro* translatiert. Während der Translation tritt der Puromycinrest in das Ribosom ein, und wird kovalent auf die wachsende Polypeptidkette übertragen. 4) Die hierbei entstandenen kovalenten Komplexe aus Polypeptid, Puromycin, DNA-Oligonukleotid und kodierender mRNA werden zur Selektion auf Bindung eines immobilisierten Zielmoleküls eingesetzt. Nichtbindende Komplexe werden durch Waschen entfernt. 5) Selektierte mRNA-Moleküle werden durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels PCR amplifiziert. Hiernach stehen die PCR-Produkte zum Einsatz als Matrizen-DNA für eine weitere Selektionsrunde bereit.

Das *mRNA display* (Roberts & Szostak, 1997), oder auch als „*in vitro virus*“ bezeichnet (Nemoto *et al.*, 1997), stellt eine weitere Möglichkeit zur *in vitro* Genotyp-Phänotyp-Kopplung dar. Der Hauptunterschied zum *ribosome display* ist hierbei, dass die Polypeptidkette kovalent mit dem kodierenden mRNA-Molekül verbunden ist. Dies wird erreicht, indem das durch *in vitro* Transkription hergestellte mRNA-Molekül am 3'-Ende mit einem 3'-Puromycin-modifiziertem DNA-Oligonukleotid ligiert wird. Während der *in vitro* Translation stoppt der ribosomale Komplex am Übergang von RNA zu DNA, was dem Puromycinrest den Eintritt in die A-Stelle des Ribosoms erlaubt. Das Nukleosid-Antibiotikum Puromycin ist strukturell dem 3'-Ende einer Tyrosyl-Transfer-RNA (tRNA) ähnlich, und kann von der Peptidyltransferaseaktivität des Ribosoms kovalent auf das C-terminale Ende der wachsenden Polypeptidkette übertragen werden (Lang, 2008). Der hierdurch entstandene kovalente Komplex aus Polypeptid, Puromycin, DNA-Oligonukleotid und kodierender mRNA kann zur Selektion auf Bindung eines immobilisierten Zielmoleküls eingesetzt werden. Im Anschluss kann der mRNA-Genotyp durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und diese durch PCR amplifiziert werden.



---

Hiernach stehen die PCR Produkte als Matrize zum Einsatz für eine weitere Selektionsrunde zur Verfügung (Roberts & Szostak, 1997; Nemoto *et al.*, 1997). Die einzelnen Schritte des *mRNA display* sind in Abbildung 1.3 schematisch dargestellt.

Eine Weiterentwicklung des *mRNA display* stellt das sogenannte *cDNA display* dar. Hierbei wird ein verzweigtes Puromycin modifiziertes Oligonukleotid verwendet, das eine Haarnadelschleife ausbildet. Dieses Oligonukleotid hybridisiert mit dem 3' Ende der mRNA und kann mit Hilfe von Reverser Transkriptase in 5' Richtung komplementär zur mRNA verlängert werden. Hierdurch entsteht eine kovalente Verknüpfung von Polypeptid, Puromycin und cDNA, was die Stabilität der Genotyp-Phänotyp-Kopplung während der Selektion erhöht (Biyani *et al.*, 2006, Yamaguchi *et al.*, 2009, Ueno & Nemoto, 2012).

Mit Hilfe des *cDNA display* wurden unter anderem Bibliotheken basierend auf disulfidreichen Neurotoxinen erfolgreich auf Bindung gegen den Interleukin-6 Rezeptor selektiert, wobei sowohl antagonistische als auch agonistische Binder angereichert werden konnten (Naimuddin *et al.*, 2011, Nemoto *et al.*, 2012). Durch Selektion in Zellkultur konnten unter Verwendung des *cDNA display* bioaktive Peptidliganden gegen G-Protein gekoppelte Rezeptoren gefunden werden (Ueno *et al.*, 2012). Das *mRNA display* wurde unter anderem zur Selektion von heterodimeren Fab Fragmenten eingesetzt, wobei die Gene der beiden Untereinheiten in einer Emulsions PCR (emPCR) fusioniert wurden (Sumida *et al.*, 2012). In Kombination mit *high throughput sequencing* (HTS) konnten mittels *mRNA display* sogar nanomolare Binder gegen unterschiedliche Zielmoleküle in einer einzigen Selektionsrunde ermittelt werden (Olson *et al.*, 2012).

Sowohl das *ribosome display* als auch das *mRNA display* stellen *in vitro* Methoden zur Kopplung von RNA und Polypeptid dar. Das Polymer RNA ist vergleichsweise instabil und anfällig für nukleolytische Degradation. So ist DNA gegenüber RNA etwa  $3 \times 10^5$ -fach stabiler in Wasser bei pH 7 (Williams *et al.*, 1999, Schroeder *et al.*, 2006), was die zu verwendenden Selektionsbedingungen dieser beiden Systeme erheblich einschränkt. Das *cDNA display* zeichnet sich durch eine Kopplung von DNA und Polypeptid aus, was deutlich härtere Bedingungen während der Selektion erlaubt. Allerdings ist beim *cDNA display*, genauso wie beim *mRNA display*, die *in vitro* Transkription der DNA Bibliothek in mRNA und die anschließende Ligation mit dem Puromycin DNA Oligonukleotid erforderlich. Dieses Handhabung des RNA Polymers erhöht die Wahrscheinlichkeit der Degradation und trägt somit

---

zur Limitation dieser Methoden bei. Gleichzeitig ist die Ligation von mRNA und Puromycin DNA Oligonukleotid nicht vollständig und wurde in der Literatur daher als limitierender Schritt für einige unterschiedliche Strategien beschrieben (Liu *et al.*, 2000, Kurz *et al.*, 2000, Miyamoto-Sato *et al.*, 2003, Tabuchi *et al.*, 2002). Wie bereits erwähnt muss im *ribosome display* versucht werden, durch kurze Translationszeiten, niedrige Temperaturen und hohe Magnesiumkonzentrationen die Degradation der mRNA und die Dissoziation der PRM-Komplexe zu verhindern. *In vitro* Methoden bei denen das Polypeptid direkt mit dem kodierenden DNA Molekül verknüpft wird, und die keine Handhabung des mRNA Transkripts erfordern, zeichnen sich im Vergleich zu den oben genannten Methoden durch eine stabilere Genotyp-Phänotyp-Kopplung aus.

### 1.2.2 *In vitro* Methoden zur Kopplung von DNA und Polypeptid: *In vitro* Kompartimentierung

Die *in vitro* Kompartimentierung (*in vitro compartmentalization*, IVC) imitiert die natürlichen zellulären Kompartimente von lebenden Organismen durch das Einschließen von DNA und den Komponenten des *in vitro* Expressionssystems in einer Wasser-in-Öl-Emulsion. Die Konzentration der Moleküle der eingesetzten DNA Bibliothek wird hierbei so gewählt, dass sich statistisch nur ein Bibliotheksmitglied, also ein DNA Molekül, in einem Wassertropfen befindet. Während der *in vitro* Proteinexpression werden pro Kompartiment mehrere Kopien des entsprechenden Proteins synthetisiert. In Abhängigkeit von der Eigenschaft, auf welche die Proteinbibliothek selektiert werden soll, wird die Genotyp-Phänotyp-Kopplung alleine durch das Kompartiment oder durch direkte Kopplung von DNA und Protein erzielt. Eine ausschließlich durch die Kompartimentierung hervorgerufene Kopplung von DNA und korrespondierendem Protein eignet sich nur, wenn sich die zu selektierende Eigenschaft bereits im Inneren des Kompartiments ausprägt. Dies ist insbesondere bei enzymatischen Reaktionen der Fall. Bei Selektion auf Bindungseigenschaften der Bibliothek ist eine direkte Kopplung von DNA und Protein erforderlich, da die Selektion in der Regel erst nach dem Aufbrechen der Emulsion erfolgen kann.

Eine Genotyp-Phänotyp-Kopplung durch IVC wurde erstmalig 1998 in den wegweisenden Arbeiten von Dan Tawfik und Andrew Griffiths beschrieben. Hierbei konnte das Gen für DNA-Methyltransferase HaeIII (*M.HaeIII*) aus *Haemophilus aegypticus* funktionell in

---

Kompartimenten *in vitro* exprimiert werden. Die neusynthetisierte DNA-Methyltransferase HaeIII konnte das kodierende DNA Molekül durch Methylierung vor einem anschließenden Verdau mit der Restriktionsendonuklease HaeIII bewahren. Eine gemischte Population aus dem Gen für Dihydrofolatreduktase (*folA*) und M.*HaeIII* wurde zur IVC eingesetzt, wobei die methylierten M.*HaeIII* Gene vor einem anschließenden Restriktionsverdau mit HaeIII geschützt waren und angereichert wurden (Tawfik & Griffiths, 1998).

Weiter konnten mit IVC als alleinige Kopplung von DNA und korrespondierendem Protein unter anderem die Sequenzspezifität der DNA-Methyltransferase HaeIII verändert werden (Cohen *et al.*, 2004), die Eigenschaften von Polymerasen verbessert und erweitert werden (Ghadessy *et al.*, 2001, Ghadessy *et al.*, 2004), auf restriktionsendonuklease Aktivität selektiert werden (Doi *et al.*, 2004) und neue DNA-Nuklease Inhibitoren isoliert werden (Bernath *et al.*, 2005). Bei Selektion auf Enzymaktivität und Umsetzung eines Substrates in ein fluoreszierendes Produkt kann eine Wasser-in-Öl-in-Wasser-Emulsion hergestellt und aktive Bibliotheksmitglieder können durch *fluorescence activated cell sorting* (FACS) selektiert werden (Bernath *et al.*, 2004, Mastrobattista *et al.*, 2005).

Eine direkte Kopplung von DNA und Protein wird als *DNA display* bezeichnet. Hierbei wird eine Matrizen-DNA eingesetzt, die für ein Fusionsprotein, bestehend aus einem Bindeprotein und der zu präsentierenden Bibliothek, kodiert. Mittels PCR wird der Matrizen-DNA über modifizierte Oligonukleotid Primer einen für das Bindeprotein entsprechenden Liganden eingefügt. Die mit diesem Liganden modifizierte Matrizen-DNA wird zur Expression in IVC eingesetzt, wobei die neu synthetisierten Bindeproteine an den Liganden der Matrizen-DNA binden und stabile DNA-Protein-Komplexe entstehen. In nächsten Schritt wird die Wasser-in-Öl-Emulsion aufgebrochen und die DNA-Protein-Komplexe zur Selektion auf Bindung eines immobilisierten Zielmoleküls eingesetzt. Durch PCR können Varianten mit gewünschten Bindungseigenschaften amplifiziert werden. Verwendet man hierbei die mit dem Liganden modifizierten Oligonukleotid Primer, so kann das PCR Produkt direkt als Matrizen-DNA in einer weiteren Selektionsrunde eingesetzt werden. Die einzelnen Schritte des *DNA display* sind in Abbildung 1.4 schematisch dargestellt.

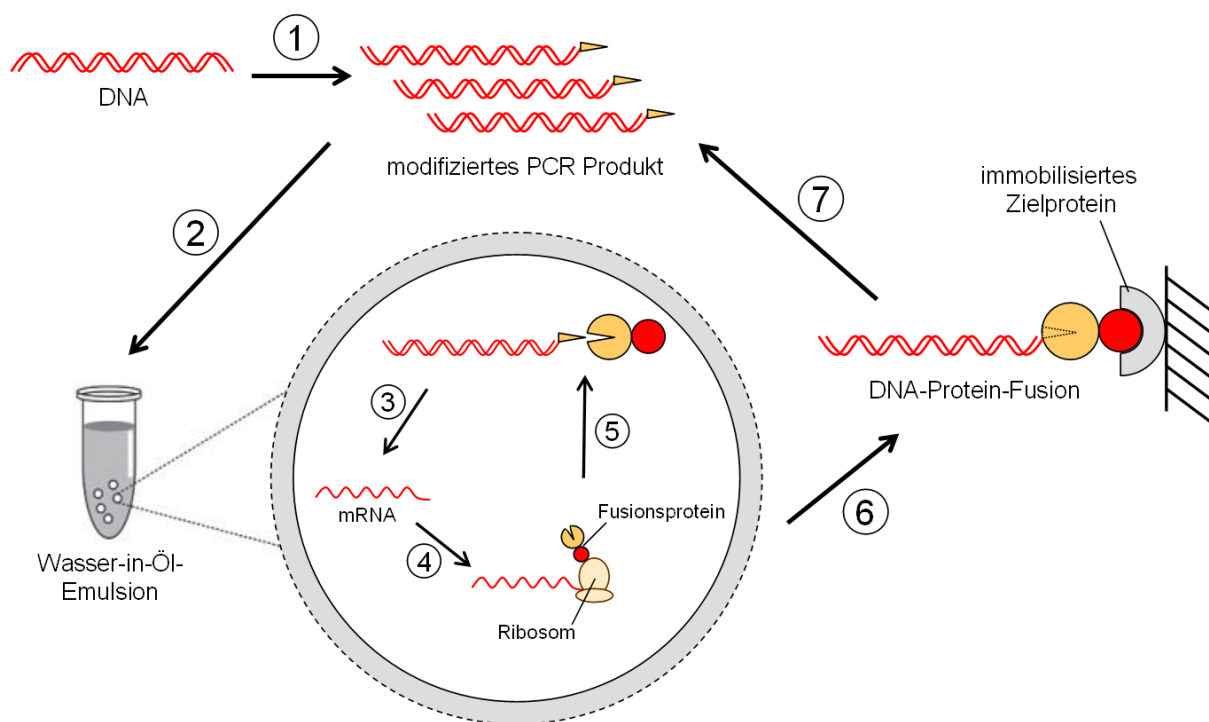


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des DNA display.

1) DNA, die für ein Fusionsprotein bestehend aus Bindeprotein und Peptid- bzw. Proteinbibliothek kodiert wird durch eine PCR amplifiziert. Hierbei werden durch modifizierte Oligonukleotid Primer die Liganden in die PCR Produkte eingebaut. 2) Die modifizierten PCR Produkte werden als Matrizen-DNA in einem *in vitro* Expressionssystem eingesetzt und durch IVC vereinzelt. 3) In den einzelnen Wasser-in-Öl Kompartimenten wird die Matrizen-DNA in mRNA transkribiert, und 4) dies in Fusionsbindeproteine translatiert. 5) Die neu synthetisierten Fusionsbindeproteine binden an den Liganden des Matrizen-DNA Moleküls, wodurch ein DNA-Protein-Komplex gebildet wird. 6) Die Wasser-in-Öl-Emulsion wird aufgebrochen, und die DNA-Protein-Komplexe werden zur Selektion auf Bindung eines immobilisierten Zielmoleküls eingesetzt. Nichtbindende Komplexe werden durch Waschen entfernt. 7) Der Genotyp der selektierten Proteinvarianten wird durch PCR amplifiziert, wobei das PCR Produkt durch Verwendung von modifizierten Oligonukleotid Primer direkt in einer weiteren Selektionsrunde eingesetzt werden kann.

Das erste DNA display wurde 1999 von Nobuhide Doi und Hiroshi Yanagawa beschrieben (Doi & Yanagawa, 1999). In diesem als STABLE (*streptavidin-biotin linkage in emulsion*) bekannten System wird die stabile Interaktion von Biotin und Streptavidin zur Genotyp-Phänotyp-Kopplung durch IVC ausgenutzt. Biotinylierte DNA Moleküle, die für ein Fusionsprotein aus Streptavidin und der Peptid- bzw. Protein-Bibliothek (Yonezawa *et al.*, 2003, Yonezawa *et al.*, 2004) kodieren, werden zur Expression in IVC eingesetzt, wobei die neu synthetisierten Streptavidin-Fusionsproteine die Biotin-Gruppe ihres kodierenden DNA-Moleküls binden können und eine nicht kovalente Kopplung von DNA und Protein entsteht (Abbildung 1.5 A). Nach dem Aufbrechen der Emulsion können die DNA-Protein-Komplexe zur Selektion auf Bindung eines immobilisierten Zielmoleküls eingesetzt und der Genotyp anschließend durch PCR amplifiziert werden.

---

Unter Anwendung von STABLE konnten zum Beispiel Streptavidinvarianten mit veränderten Eigenschaften (Bindungsspezifität für Desthiobiotin) angereichert werden (Levy & Ellington, 2008). Ebenso konnten heterodimere Fab Fragmente selektiert werden, wobei die Gene der beiden Untereinheiten bicistronisch auf einem DNA Molekül kodiert wurden (Sumida *et al.*, 2009). Weiter wurde eine Peptidbibliothek auf Bindung gegen einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (humaner Angiotensin II Rezeptor), der auf CHO-K1 Zelle präsentiert wurde, selektiert (Doi *et al.*, 2012).

Das erste kovalente DNA *display* System unter Verwendung von IVC wurde 2004 von Julian Bertschinger und Dario Neri beschrieben. Hierbei wird eine Fusion der DNA Bibliothek mit M.HaeIII als Bindeprotein zur Expression in IVC eingesetzt. Das Enzym HaeIII Methyltransferase kann mit DNA Fragmenten, welche die Suizidinhistor-Sequenz 5'-GGFC-3' (F=5-Fluoro-2'-deoxycytidin) als Ligand beinhalten unter Ausbildung einer kovalenten Bindung reagieren (Chen *et al.*, 1991). Diese Suizidinhistor-Sequenz wird über PCR *primer* in die kodierenden DNA-Moleküle eingebracht, wodurch das neu synthetisierte HaeIII Methyltransferase-Fusionsprotein an diese kovalent binden kann (Abbildung 1.5 B). Nach dem Aufbrechen der Emulsion können die DNA Moleküle, welche für ein Fusionsprotein mit gewünschten Bindungseigenschaften kodiert, durch Affinitätsselektion angereichert werden (Bertschinger & Neri, 2004, Bertschinger *et al.*, 2007). Neben Modellexperimenten konnten mit dem kovalenten DNA *display* System unter Verwendung von HaeIII Methyltransferase-Fusionen hoch nanomolare Binder gegen Maus Serum Albumin angereichert werden (Bertschinger *et al.*, 2007).

Ein weiteres kovalentes DNA *display* System zur Genotyp-Phänotyp-Kopplung stellt das so genannte SNAP *display* dar. Hierbei wird die in der Arbeitsgruppe von Kai Johnsson entwickelte gleichnamige Technologie verwendet, bei der das Zielprotein als Fusion mit O<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase, dem so genannten SNAP-tag als Bindeprotein exprimiert wird und welches kovalent das Substratanalog O<sup>6</sup>-Benzylguanin (BG) binden kann (Keppler *et al.*, 2003, Keppler *et al.*, 2004). Durch die Verwendung von modifizierten PCR *primern* wird die BG-Bindungsgruppe in die DNA Bibliothek eingeführt und zur IVC eingesetzt. Die SNAP-tag-Fusionsproteine werden exprimiert und können an den BG-Gruppen ihr eigenes kodierendes DNA Molekül kovalent binden (Abbildung 1.5 C). Die hierbei entstandenen DNA-Protein-Fusionen können nach dem Aufbrechen der Emulsion zur Selektion auf Bindung gegen

immobilisierte Zielmoleküle eingesetzt werden. Der Genotyp der selektierten DNA-Protein-Fusionen kann nun mittels PCR amplifiziert und in einer weiteren Selektionsrunde eingesetzt werden (Stein *et al.*, 2007, Kaltenbach & Hollfelder, 2012). Das SNAP *display* wurde bisher ausschließlich in Modellexperimenten eingesetzt, wobei in einem multivalenten SNAP *display* der Einfluss an Valenzen der präsentierten Proteine auf Anreicherung und DNA Rückgewinnung untersucht wurde (Kaltenbach *et al.*, 2011, Houlihan *et al.*, 2014).

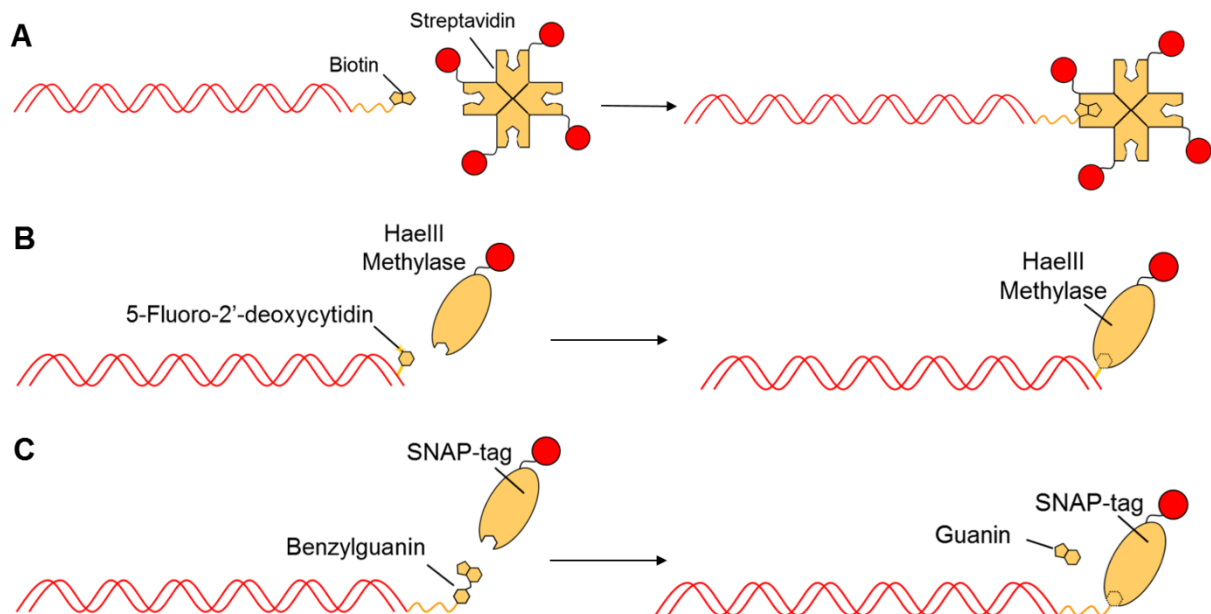


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung verschiedener Genotyp-Phänotyp-Kopplungsmethoden für das DNA *display*.

A) Genotyp-Phänotyp-Kopplung des STABLE Systems. Biotinylierte Matrizen-DNA, die für ein Fusionsprotein aus dem Bindeprotein Streptavidin und der Peptid- bzw. Proteinbibliothek kodiert, kann von dem tetrameren Fusionsprotein nichtkovalent gebunden werden. B) Genotyp-Phänotyp-Kopplung des M.*HaeIII* Systems. Eine Matrizen-DNA, welche die Suizidinhibitor-Sequenz 5'-GGFC-3' als Ligand beinhaltet, und für ein Fusionsprotein aus *HaeIII* Methyltransferase und der zu präsentierenden Bibliothek kodiert, kann von dem Fusionsprotein kovalent gebunden werden. C) Genotyp-Phänotyp-Kopplung des SNAP *display* Systems. Hierbei trägt die Matrizen-DNA das Substratanalog BG als Ligand, und kodiert für ein Fusionsprotein aus SNAP-tag als Bindeprotein und der zu präsentierenden Bibliothek. Hierdurch kann die Matrizen-DNA von dem Fusionsprotein kovalent gebunden werden.

Bei den meisten *in vitro* Systemen zur Genotyp-Phänotyp-Kopplung wird, im Gegensatz zu zellbasierten Systemen, ein einzelnes Protein mit dem dazugehörigen mRNA oder DNA Molekül verknüpft. Dies hat zur Folge, dass schwach bindende Bibliotheksmitglieder bereits in der ersten Selektionsrunde verloren gehen können, da ihre Interaktion mit dem Zielprotein für eine erfolgreiche Affinitätsselektion nicht stark genug ist. Um die Wahrscheinlichkeit der Selektion von schwach bindenden Bibliotheksmitgliedern zu erhöhen, ist ein multivalentes System zur Genotyp-Phänotyp-Kopplung geeignet. Durch Ligation der zur *in vitro* Proteinexpression eingesetzten DNA mit Dendrimer-ähnlichen DNA Fragmenten, die mit BG-Gruppen funktionalisiert sind, ist ein polyvalentes SNAP *display* möglich. In Selektionsstudien mit mono-,

---

bi- und tetravalenten Konstrukten zeigte sich, dass Aviditätseffekte die Anreicherung pro Selektionsrunde fünffach und die DNA Rückgewinnung bis zu 25-fach verstärken können (Kaltenbach *et al.*, 2011). Auch bei STABLE konnte die Anreicherung und DNA Rückgewinnung durch den Einsatz von DNA Bibliotheken, die an beiden Enden Biotin-Gruppen tragen signifikant verbessert werden (Yonezawa *et al.*, 2003). Durch die tetramere Struktur von Streptavidin ist bei diesem System eine Tetra- bzw. Octavalenz von Peptidbibliotheken gegeben, jedoch scheint die Tetramerisierung der Streptavidin-Fusionsproteine bei Proteinbibliotheken von der Länge des Abstandshalters der beiden Proteindomänen abhängig (Yonezawa *et al.*, 2003, Yonezawa *et al.*, 2004).

Eine weitere Möglichkeit für eine multivalente *in vitro* Genotyp-Phänotyp-Kopplung stellen die als *microbead display* bezeichneten Systeme dar. Hierzu wurden unterschiedliche Varianten beschrieben. In der einen Variante wird jeweils ein Molekül der biotinylierten DNA Bibliothek zusammen mit biotinylierten Antikörpern auf Streptavidin Microbeads immobilisiert und zur Proteinexpression in IVC eingesetzt. Die neusynthetisierten Proteine beinhalten eine Peptidsequenz die an die immobilisierten Antikörper bindet, so dass eine Genotyp-Phänotyp-Kopplung über Biotin-Antikörper, Streptavidin-Microbeads und Biotin-DNA vermittelt wird. Die Emulsion wird nun aufgebrochen, und die Microbeads werden mit dem Zielprotein inkubiert. Das gebundene Zielprotein als Fusion mit Meerrettichperoxydase (*horseradish peroxidase*, HRP) kann mit Wasserstoffperoxid das Substrat Fluoresceintyramid in ein kurzlebiges freies Radikal umwandeln, was mit Proteinen in räumlicher Nähe reagiert und somit zu einer Fluorescein-Markierung der Microbeads führt (Sepp *et al.*, 2002). Die Fluorescein markierten Microbeads können durch FACS angereichert, und der immobilisierte Genotyp kann mittels PCR amplifiziert werden. Wahlweise können auch direkt Fluoreszenz markierte Zielproteine zur Markierung der Microbeads eingesetzt werden (Nord *et al.*, 2003). Die einzelnen Schritte dieses *microbead displays* sind in Abbildung 1.6 schematisch dargestellt.



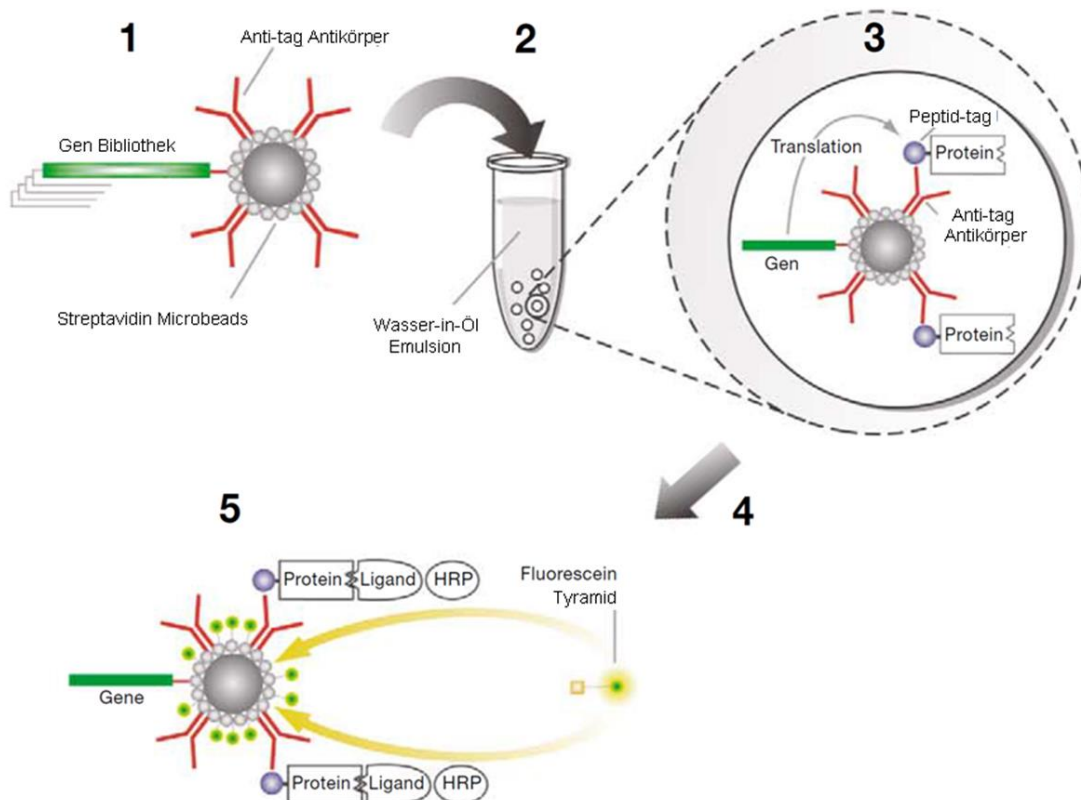


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des *microbead display* aus Sepp *et al.*, 2002.

1) Jeweils ein Molekül der biotinylierten DNA Bibliothek wird zusammen mit biotinylierten Antikörpern auf Streptavidin Microbeads immobilisiert. 2) Die Microbeads werden zur zellfreien Proteinexpression der immobilisierten Gene in IVC eingesetzt. 3) Im Inneren der Kompartimente findet die *in vitro* Proteinexpression statt. Das hierbei entstandene Proteinprodukt bindet an den immobilisierten Antikörper. 4) Die Emulsion wird aufgebrochen, und die Microbeads zur Selektion eingesetzt. 5) Hierbei werden die Microbeads mit dem als HRP-Fusion vorliegenden Liganden (Zielprotein) inkubiert. Nichtbindende HRP-Fusionen werden durch Waschen entfernt. Die immobilisierten HRP-Fusionen wandeln das Substrat Fluoresceintyramid in ein kurzlebiges freies Radikal um, welches mit den benachbarten Proteinen reagiert und hierdurch zu einer Fluorescein-Markierung der Microbeads führt. Diese markierten Microbeads können durch FACS angereichert, und der entsprechende Genotyp über PCR amplifiziert werden. (Modifiziert nach Sepp *et al.*, 2002)

Eine andere Variante des *microbead display* verwendet ebenfalls Streptavidin Microbeads auf denen jeweils ein Molekül der biotinylierten DNA Bibliothek immobilisiert wird. Allerdings werden in diesem Fall die einzelnen Bibliotheksmitglieder in einer emPCR amplifiziert, wodurch Microbeads entstehen die jeweils eine große Anzahl an gebundenen DNA Molekülen desselben Bibliotheksmitglieds präsentieren. Bei dieser PCR ist der biotinylierte *reverse* Primer bereits auf der Microbeadoberfläche immobilisiert, wobei sich der ebenfalls biotinylierte *forward* Primer in Lösung befindet. Somit weist auch das freie nicht immobilisierte Ende der DNA eine Biotinylierung auf. Im Anschluss an die PCR werden die Microbeads mit Streptavidin inkubiert, was an die Biotin-Gruppen der freien DNA Enden binden kann. Im nächsten Schritt werden die Microbeads mit einem biotinylierten Antikörper inkubiert, der an die drei noch freien Streptavidin Untereinheiten des tetrameren Proteins bindet, und gegen ein auf der DNA



Bibliothek kodierte Epitop gerichtet ist. Nun erfolgt die IVC und Proteinexpression, wobei neusynthetisierte Proteine an den Antikörper binden und über Streptavidin mit den kodierenden DNA Molekülen verbunden sind. Zur Selektion werden die Microbeads mit Fluoreszenz-markierten Zielproteinen inkubiert, und können nun durch FACS angereichert und der immobilisierte Genotyp kann mittels PCR amplifiziert werden (Gan *et al.*, 2008, Gan *et al.*, 2010). Die einzelnen Schritte dieses *microbead displays* sind in Abbildung 1.7 schematisch dargestellt.

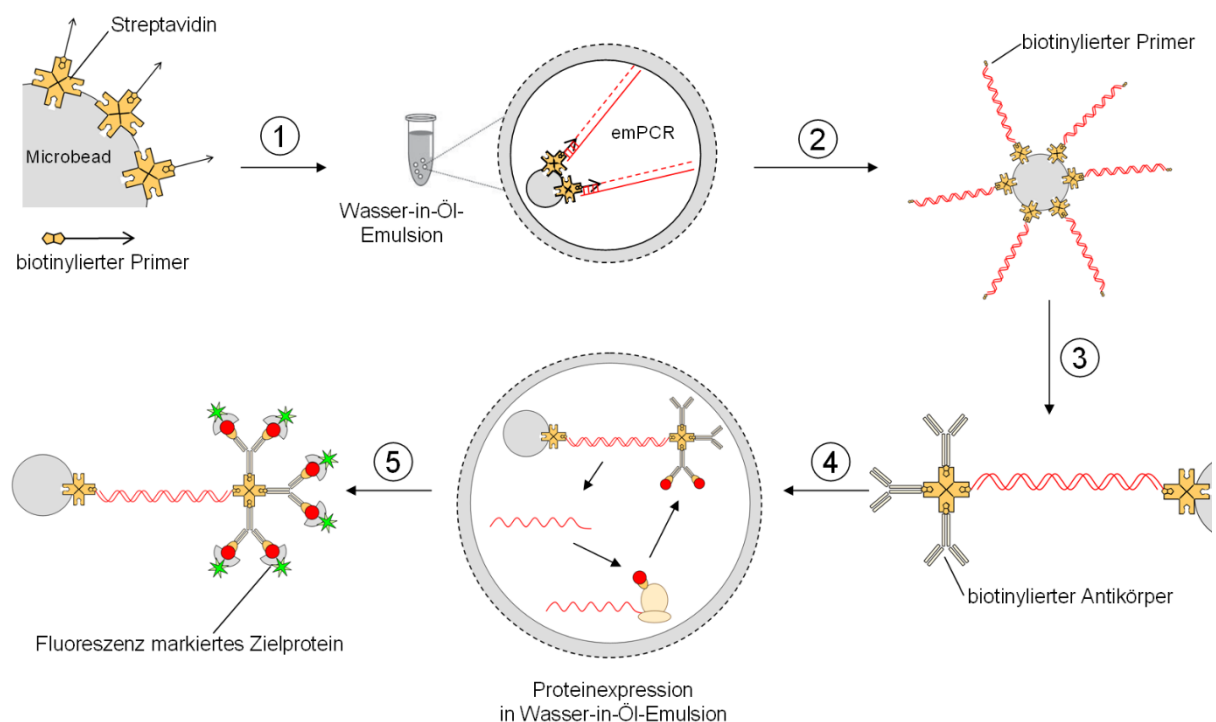


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung des *microbead display* nach Gan *et al.*, 2008.

1) Auf Streptavidin Microbeads werden biotinylierte *reverse* Primer immobilisiert, und diese in einer emPCR zur Amplifikation der jeweils einzelnen Bibliotheksmitglieder eingesetzt. Durch die Verwendung von biotinylierten *forward* Primern in Lösung trägt das freie DNA Ende ebenfalls eine Biotingruppe. 2) Die Emulsion wird aufgebrochen. Einzelne Microbeads tragen jeweils multiple Kopien eines einzelnen Bibliotheksmitglieds. 3) Die Microbeads werden zunächst mit freiem Streptavidin inkubiert, was an die Biotingruppen der freien DNA Enden bindet. An die drei noch freien Bindungsstellen des tetrameren Proteins werden biotinylierte Antikörper gebunden, die gegen ein auf der immobilisierten DNA kodiertes Epitop gerichtet sind. 4) Die Microbead Komplexe werden zur zellfreien Proteinexpression in einer Wasser-in-Öl-Emulsion eingesetzt. Hierbei wird die DNA zunächst in mRNA transkribiert, und hiernach das Fusionsprotein translatiert. Dieses kann nun an den immobilisierten Antikörper binden, wodurch eine Genotyp-Phänotyp-Kopplung entsteht. 5) Zur Selektion werden die Microbead Komplexe mit Fluoreszenz markierten Zielproteinen inkubiert. Bibliotheksmitglieder, die das Zielprotein binden, können durch FACS angereichert werden. Der selektierte Genotyp kann nun durch PCR amplifiziert werden.

In einer weiteren Variante, dem sogenannten *bead surface display* (in der Literatur auch als BeSD abgekürzt) wird die SNAP-tag Technologie mit dem *microbead display* kombiniert (Diamante *et al.*, 2013, Paul *et al.*, 2013). Wie in dem bereits beschriebenen *microbead display* werden hier Microbeads mittels emPCR generiert, die mit multiplen Kopien einzelner

Bibliotheksmitglieder über eine Streptavidin Biotin Interaktion dekoriert sind. Die hierzu verwendete Bibliothek kodiert ein Fusionsprotein aus Zielprotein und SNAP-tag. In der emPCR werden biotinylierte *forward* Primer sowie BG modifizierte *reverse* Primer verwendet. Über die Biotin-Gruppe des *forward* Primers werden die PCR Produkte auf den Streptavidin Microbeads immobilisiert. Die während IVC gebildeten SNAP-tag-Fusionsproteine binden kovalent die BG-Gruppen der *reverse* Primer, wodurch eine multivalente Genotyp-Phänotyp-Kopplung erzielt wird. Diese können nun zur Bindung auf ein markiertes Zielprotein eingesetzt und durch FACS selektiert werden. Die einzelnen Schritte dieses *bead surface displays* sind in Abbildung 1.8 schematisch dargestellt.

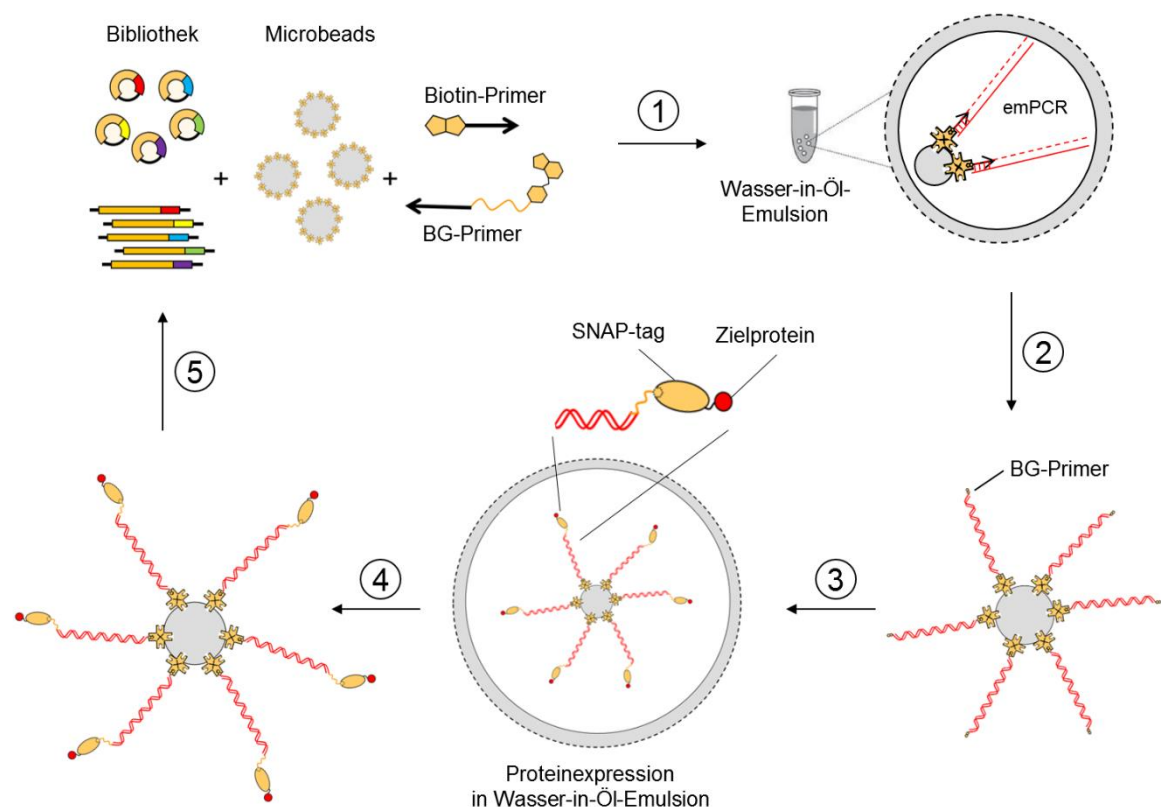


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung des *bead surface displays* nach Diamante *et al.*, 2013.

1) Eine Bibliothek, welche für ein SNAP-tag Fusionsprotein kodiert, wird zusammen mit Streptavidin Microbeads, Biotin markierten *forward* Primern und BG modifizierten *reverse* Primern in einer emPCR eingesetzt. 2) Die Emulsion wird aufgebrochen. Einzelne Microbeads tragen jeweils multiple Kopien eines einzelnen Bibliotheksmitglieds. 3) Die Microbead Komplexe werden zur zellfreien Proteinexpression in einer Wasser-in-Öl-Emulsion eingesetzt. Hierbei wird die DNA zunächst in mRNA transkribiert, und hiernach das Fusionsprotein translatiert. Dieses bindet nun kovalent die BG-Gruppe des *reverse* Primers, wodurch eine Genotyp-Phänotyp-Kopplung entsteht. 4) Die Emulsion wird aufgebrochen und die Microbead Komplexe werden zur Selektion auf Bindung markierter Zielproteine eingesetzt. 5) Bibliotheksmitglieder, die das Zielprotein binden, können durch FACS angereichert werden. Der selektierte Genotyp kann nun durch PCR amplifiziert und in einer weiteren Selektionsrunde eingesetzt werden.

---

### 1.3 Systeme zur zellfreien Protein Expression

Bereits anfangs der 1950er Jahren gelangte man zu der Erkenntnis, dass die Proteinbiosynthese auch nach einem Zellaufschluss weiter stattfinden kann, und nicht zwingend auf die Unversehrtheit von Zellen angewiesen ist (Borsook, 1950, Winnick, 1950). In den ersten Systemen zur *in vitro* Translation konnte jedoch ausschließlich endogene mRNA, die bereits während dem Zellaufschluss an die Ribosomen gebunden ist, in Protein umgeschrieben werden (Littelfield *et al.*, 1955, Schachtschabel & Zillig, 1959). Ein bahnbrechender Schritt in der Entwicklung von zellfreien Translationssystemen war der Einsatz von exogener mRNA zur Proteinproduktion. Durch Vorinkubation des *E. coli* Zellextraktes bei physiologischen Temperaturen konnte die endogene mRNA entfernt und exogene natürliche mRNA sowie synthetische Polyribonukleotide von den Ribosomen zur Peptidsynthese verwendet werden (Nirenberg & Matthaei, 1961). Durch den Einsatz von  $\text{Ca}^{2+}$  abhängigen RNasen konnte in den folgenden Jahren auch ein System zur *in vitro* Translation von exogener RNA auf der Basis von Kaninchen Retikulozyten-Lysat etabliert werden (Pelham & Jackson, 1976). Ein weiteres System zur zellfreien Proteinsynthese, das auf Weizenkeimextrakt basiert, kann aufgrund des niedrigen Niveaus an endogener mRNA direkt zur Translation von exogener RNA verwendet werden (Roberts & Paterson, 1973, Marcus *et al.*, 1974).

Ein weiterer bedeutender Schritt war die Entwicklung eines gekoppelten *in vitro* Transkriptions-/Translationssystems (IVTT) unter Verwendung von *E. coli* Extrakten (Wood & Berg, 1962, Lederman & Zubay, 1967, Gold & Schweiger, 1969). Hierbei wird eine Matrizen-DNA zu dem Expressionsansatz gegeben, und durch endogene RNA Polymerasen aus dem bakteriellen Extrakt *in situ* in mRNA transkribiert, und bereits während der Synthese in Protein translatiert. Auch in eukaryotischen Systemen ist eine kombinierte Translation und Transkription möglich (Craig *et al.*, 1992, Baranov & Spirin, 1993). Da diese Systeme jedoch aus zytoplasmatischen Fraktionen hergestellt sind und daher keine endogenen RNA Polymerasen beinhalten, müssen hier exogene RNA Polymerasen zugefügt werden. Isolierte RNA Polymerasen der Bakteriophagen T7 und SP6 haben sich hierbei als besonders geeignet erwiesen, und können auch *E. coli* Extrakt IVTT Systemen zugesetzt werden (Nevin & Pratt, 1991).

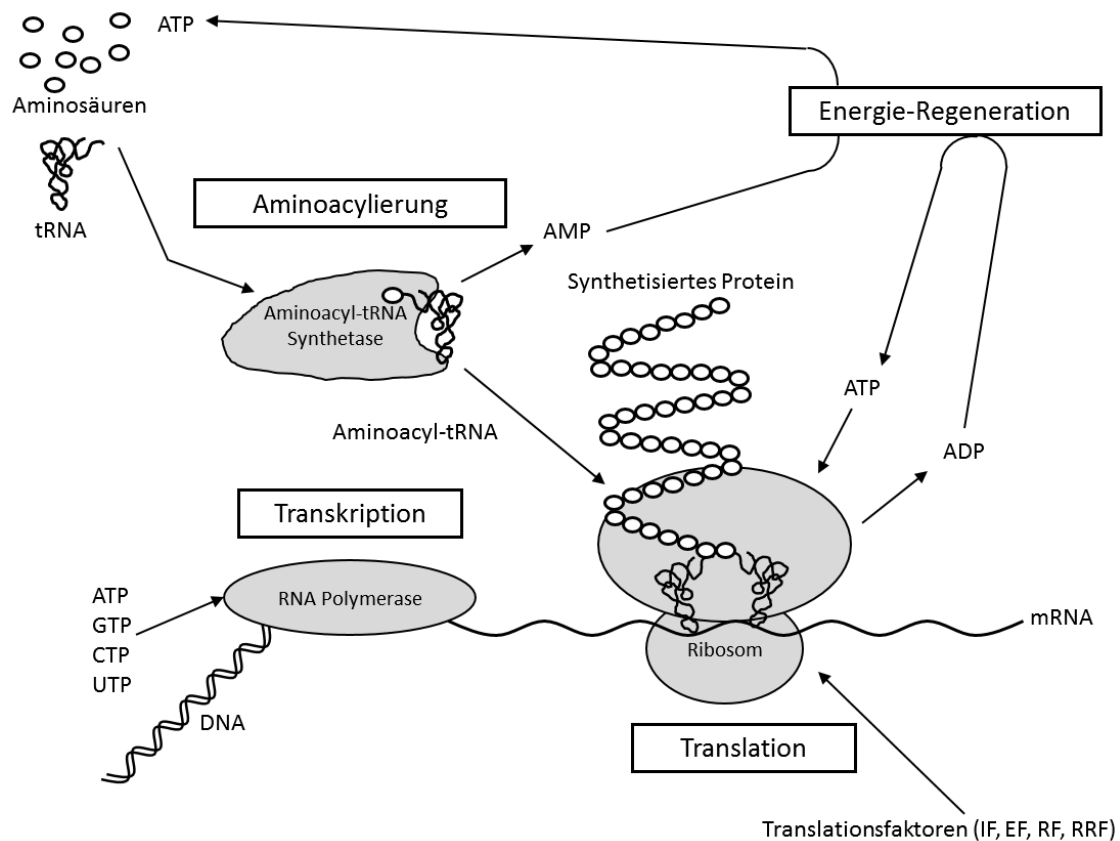


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der zellfreien Proteinsynthese. Die wichtigsten Komponenten der IVTT, und das Zusammenspiel der vier Hauptreaktionen Aminoacylierung, Transkription, Translation und Energie-Regeneration ist hier schematisch dargestellt. (Modifiziert nach Shimizu *et al.*, 2005)

Grundlegend für eine erfolgreiche zellfreie Proteinsynthese ist, dass alle essentiellen Komponenten im *in vitro* Expressionssystem enthalten sind. Welche einzelnen Bestandteile dies beinhaltet wurde für ein prokaryotisches System 1977 erstmals beschrieben (Kung *et al.*, 1977). Auf diesen Erkenntnissen aufbauend entwickelten Ueda *et al.* das sogenannte PURE System (*protein synthesis using recombinant elements*). Im Gegensatz zu herkömmlichen Verfahren beinhaltet das PURE System kein Zellextrakt, sondern setzt sich ausschließlich aus rekombinant hergestellten und gereinigten Komponenten des *E. coli* Translationsapparates zusammen (Shimizu *et al.*, 2001, Shimizu *et al.*, 2005, Tuckey *et al.*, 2014). Hierzu gehören gereinigte Ribosomen, tRNAs, Translationsfaktoren, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, Aminosäuren, Nukleosidtriphosphate (NTPs), T7 RNA Polymerase, sowie weitere Enzyme und andere Bestandteile die für eine Proteinsynthese erforderlich sind, wie zum Beispiel die Komponenten eines Energie-Regenerationssystems (Shimizu & Ueda, 2010). In Abbildung 1.9 ist die zellfreie Proteinsynthese mit den wichtigsten Komponenten und Hauptreaktionen schematisch dargestellt.

---

Die Proteinbiosynthese ist ein Energie-abhängiger metabolischer Prozess bei dem hauptsächlich Adenosintriphosphat (ATP) als Energielieferant für Transkriptionsfaktoren und Aminoacyl-tRNA-Synthetasen fungiert. Um die Energieversorgung des Systems für einen längeren Zeitraum zu gewährleisten ist eine *in situ* Synthese von ATP zwingend erforderlich. Hierzu werden in der Regel energiereiche Phosphatdonatoren wie Phosphoenolpyruvat (PEP), Acetylphosphat (AcP) oder Kreatinphosphat zugegeben, welche von endogenen oder exogen beigefügten Enzymen zur ATP Synthese verwendet werden (Ryabova *et al.*, 1994, Kigawa *et al.*, 1999).

Bei einer zellfreien Proteinsynthese, die in einem Reaktionsgefäß mit einem festgesetzten Volumen erfolgt (dem sogenannten *batch* Verfahren), führt die Verwertung der Substrate und die Anhäufung der Produkte zu einer kontinuierlichen Veränderung der Reaktionsbedingungen. Sobald eines der essentiellen Substrate verbraucht ist, oder ein Produkt oder Nebenprodukt eine inhibitorische Konzentration erreicht hat, kann die Translation nicht weiter stattfinden. Somit kommt die Proteinsynthese nach etwa 20-60 min zu erliegen, was relativ niedrige Proteinausbeuten zur Folge hat (Spirin & Swartz, 2008). Um die Proteinsynthese über einen längeren Zeitraum aufrecht zu erhalten, und somit größere Mengen an Protein auch für präparative Zwecke erzeugen zu können, wurden die als *continuous-exchange cell-free* (CECF) und *continuous-flow cell-free* (CFCF) bezeichneten Systeme entwickelt. Hierbei ist die Reaktionslösung über eine Ultrafiltrationsmembran mit einer Nährlösung verbunden, so dass dem System kontinuierlich die verbrauchten Substrate wie Aminosäuren, NTPs sowie energiereiche Phosphatdonatoren zugeführt werden können und gleichzeitig Nebenprodukte wie Nukleosidmonophosphate und anorganisches Phosphat ( $P_i$ ) aus dem System entfernt werden. Hierdurch wird gewährleistet, dass die Reaktionsbedingungen über die gesamte Reaktionszeit mehr oder weniger konstant sind, wodurch die Proteinsynthese über bis zu 40 Stunden aufrecht erhalten werden kann, was die Proteinausbeute auf einige mg pro ml Reaktionslösung steigert (Spirin *et al.*, 1988, Spirin & Swartz, 2008).

#### 1.4 HaloTag® Technologie

Die von der Firma Promega entwickelte HaloTag® Technologie eignet sich unter anderem zur kovalenten Markierung und Immobilisierung von Proteinen, und kann sowohl *in vivo* als auch

*in vitro* eingesetzt werden. Hauptbestandteil dieser Technologie ist das sogenannte HaloTag Protein, eine modifizierte Haloalkan Dehalogenase aus *Rhodococcus rhodochrous* (DhaA).

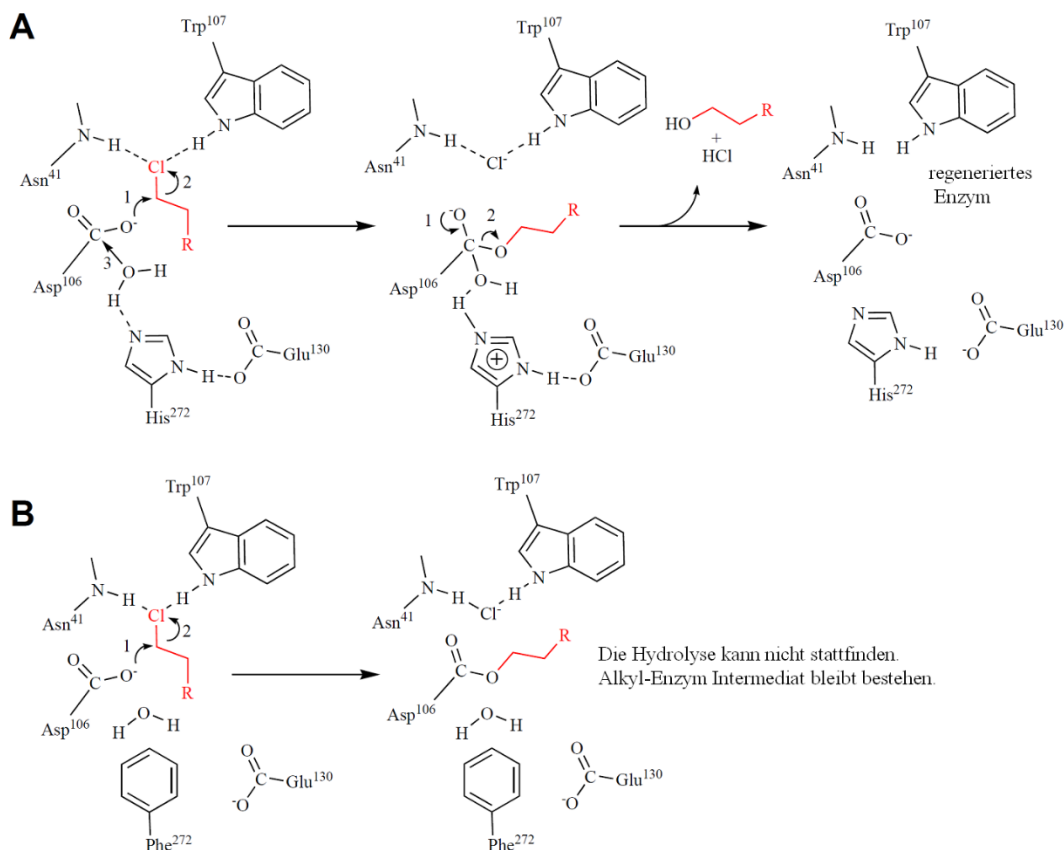


Abbildung 1.10: Reaktionsmechanismus der Dehalogenierung durch DhaA (A) und Kopplung des Substrates an das HaloTag Protein (B).

A) Im ersten Schritt der Katalyse erfolgt ein nukleophiler Angriff der Aminosäure Asp<sup>106</sup> auf das alpha-Kohlenstoff Atom des Chloralkan Substrats (in rot dargestellt). Hierbei entsteht ein kovalentes Alkyl-Enzym Intermediat. Die Aminosäure His<sup>272</sup> katalysiert die Hydrolyse dieses Intermediats. Die Reaktionsprodukte werden frei, und das Enzym liegt im Ausgangszustand vor. Die Aminosäure Glu<sup>130</sup> ist so im aktiven Zentrum angeordnet, dass sie die bei der Hydrolyse entstehende positive Ladung von His<sup>272</sup> stabilisiert. Die Aminosäuren Trp<sup>107</sup> und Asn<sup>41</sup> sind zum einen für die Substratbindung entscheidend, und stabilisieren das bei der Spaltung freiwerdende Halid (Cl<sup>-</sup>). B) Durch den Austausch der Aminosäure His<sup>272</sup> in Phe kann diese Aminosäure nicht mehr als Base fungieren, und das Alkyl-Enzym Intermediat kann nicht hydrolysiert werden. (Modifiziert nach Encell *et al.*, 2012)

Haloalkan Dehalogenasen sind monomere Enzyme, die die Spaltung von Halogenkohlenwasserstoff-Verbindungen katalysieren. Diese Spaltung findet in zwei Schritten statt. Im ersten Schritt findet ein nukleophiler Angriff auf die Kohlenstoff-Halogen-Bindung des Substrats durch die katalytische Aminosäure Aspartat statt. Hierbei wird der Halogenkohlenwasserstoff gespalten, wobei der Alkyl-Rest kovalent über die Aminosäure Aspartat mit dem Enzym verbunden bleibt und ein Alkyl-Enzym Intermediat entsteht. Im zweiten Schritt erfolgt nun die Abspaltung des Alkyl-Rests, indem ein Histidin Rest die

---

Hydrolyse des Alkyl-Enzym Intermediats katalysiert (Abbildung 1.10 A). Der hierbei gebildete Alkohol, sowie das Halid werden frei und das Enzym kehrt in seinen Ausgangszustand zurück (Pries *et al.*, 1994, Janssen, 2004).

Bei dem HaloTag Protein wurde nun die Aminosäure Histidin im aktiven Zentrum der DhaA gegen Phenylalanin ausgetauscht. Das Chloralkan Substrat wird auch hier von der Aminosäure Aspartat angegriffen, und es entsteht ein kovalentes Alkyl-Enzym Intermediat. Durch den Austausch von Histidin gegen Phenylalanin kann jedoch keine Hydrolyse der Esterbindung des Alkyl-Enzym Intermediats stattfinden, wodurch das Substrat kovalent mit dem HaloTag Protein verbunden bleibt (Abbildung 1.10 B) (Los *et al.*, 2008, Encell *et al.*, 2012).

Das 33 kDa große HaloTag Protein kann sowohl als N- oder C-terminale Fusion mit dem Zielprotein exprimiert werden. Je nach Wahl des als HaloLink bezeichneten Chloralkan Liganden sind unterschiedliche Anwendungen möglich. So wird die HaloTag Technologie unter anderem zur Proteinreinigung, Lokalisation, Immobilisierung und insbesondere zum *in vitro* als auch *in vivo* Imaging eingesetzt (Ohana *et al.*, 2011, Hong *et al.*, 2011, Taniguchi & Kawakami, 2010, Cong, 2012).

## 1.5 Zielsetzung

In dieser Arbeit soll das Repertoire bekannter Technologien zur Genotyp-Phänotyp-Kopplung durch kovalente Verknüpfung eines Zielproteins mit seiner eigenen codierenden Sequenz um einen experimentellen Ansatz erweitert werden, in dem die kovalente Verknüpfung der Haloalkan Dehalogenase mit einem Chloralkan-Substrat als Kopplungsprinzip ausgenutzt wird. Dadurch soll das Polypeptid direkt oder über Microbeads mit dem kodierenden DNA Molekül verknüpft werden. Diese Verknüpfung soll unter Verwendung der HaloTag Technologie erfolgen und nach Möglichkeit mehrere Valenzen aufweisen.

Um dies kostengünstig umsetzen zu können, soll ein nichtkommerzielles System zur zellfreien Proteinexpression etabliert werden. Unter Verwendung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) als Reporterprotein sollen die Ausbeuten der zellfreien Proteinexpression optimiert, und die zellfreie Expression von funktionellen HaloTag Fusionsproteinen nachgewiesen werden.

Weiter soll gezeigt werden, ob mit Hilfe der HaloTag Technologie eine Kopplung von DNA und Polypeptid erzielt werden kann, und die hierbei entstandenen Komplexe zur Affinitätsselektion eingesetzt werden können. Dies soll durch Mischen zweier unterschiedlicher Komplexe und

---

Affinitätsselektion einer der Varianten erfolgen. Weiter soll durch die Anreicherung eines Genotyps, aus einem Gemisch zweier Genotyp Varianten, eine Genotyp-Phänotyp-Kopplung, also die Kopplung des Fusionsproteins mit dem kodierenden DNA Molekül nachgewiesen werden.

Kann die Ausbildung einer Genotyp-Phänotyp-Kopplung in diesem System nachgewiesen werden, soll eine Bibliothek mit einer randomisierten Peptidsequenz erstellt werden. In Modellanreicherungsexperimenten soll das System auf seine Praxistauglichkeit hin überprüft werden.



## 2 Materialien

### 2.1 Bakterienstämme

*E. coli* XL-1 blue (Stratagene, USA)

*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F *proAB lacI<sup>q</sup> Z M15 Tn10* (Tet<sup>r</sup>)]

### 2.2 Plasmide

#### 2.2.1 pET22b-sGFP

Der Vektor pET22b-sGFP wurde von der Arbeitsgruppe von Dr. Frank Bernhard vom Institut für Biophysikalische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt zur Verfügung gestellt.

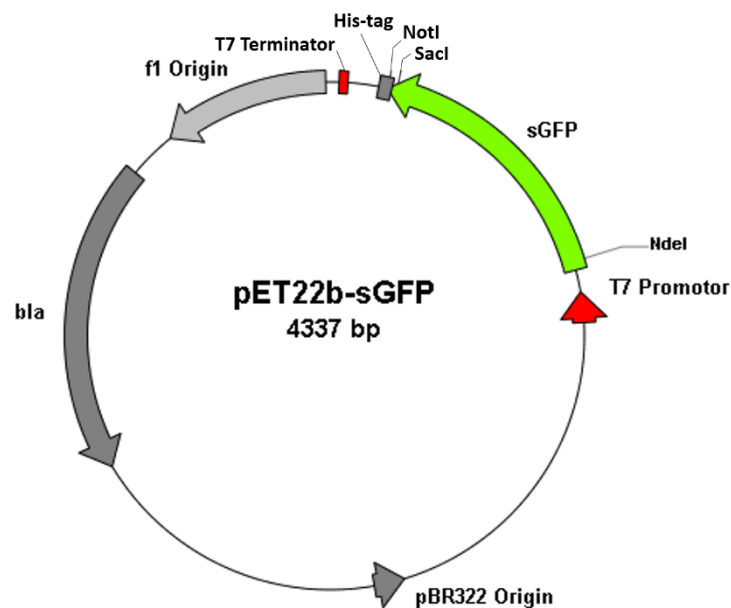


Abbildung 2.1: Genetische Karte des Plasmids pET22-sGFP.

Die funktionelle Orientierung der genetischen Elemente wird durch die Pfeilrichtung angegeben. *T7 Terminator*: T7 Terminatorsequenz, *His-tag*: kodierende Sequenz des hexa-Histidin-tags, *sGFP*: kodierende Sequenz für *red shifted green fluorescent protein*, *NotI*, *SacI*, *NdeI*: Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen, *T7 Promotor*: T7 Promotorsequenz, *pBR322 Origin*: Replikationsursprung des Vektors pBR322, *bla*: kodierende Sequenz des Enzyms  $\beta$ -Lactamase (hierdurch vermittelte Ampicillinresistenz), *f1 Origin*: Replikationsursprung des filamentösen Phagen f1.

## 2.2.2 pET22b-sGFP-HaloTag-MP/myc

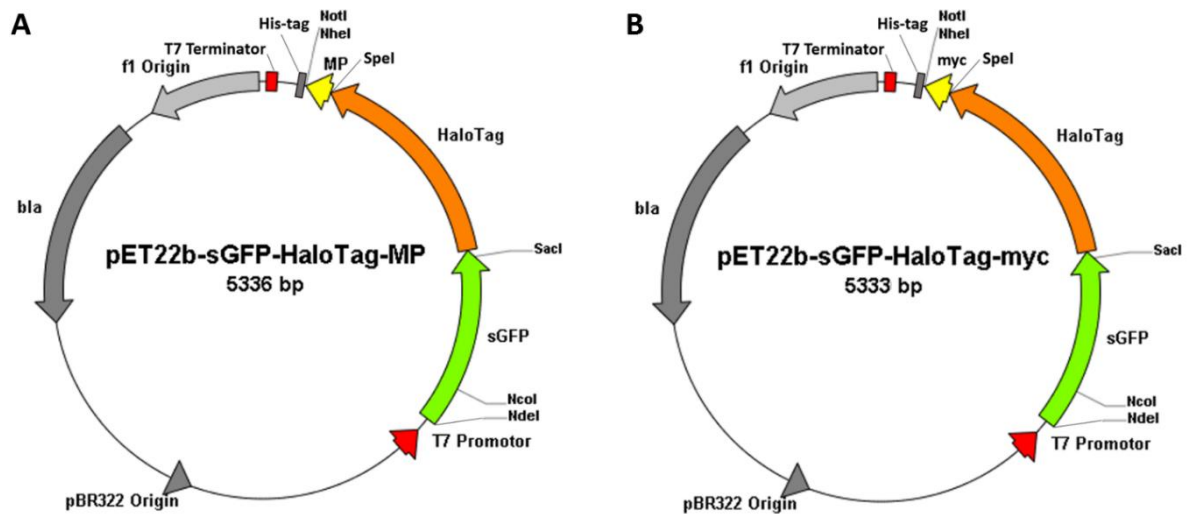


Abbildung 2.2: Genetische Karte der Plasmide pET22-sGFP-HaloTag-MP und pET22-sGFP-HaloTag-myc. Die funktionelle Orientierung der genetischen Elemente wird durch die Pfeilrichtung angegeben. *T7 Terminator*: T7 Terminatorsequenz, *His-tag*: kodierende Sequenz des hexa-Histidin-tags, *MP*: kodierende Sequenz des Mimiproteins oMCoT-II (A), *myc*: kodierende Sequenz des Mimiproteins oMCoT-II mit Austausch der inhibitor Loop Sequenz, gegen die Sequenz des c-myc Epitops (B), *HaloTag*: kodierende Sequenz des HaloTag® Proteins (Promega), *sGFP*: kodierende Sequenz für *red shifted green fluorescent protein*, *NotI*, *NheI*, *SpeI*, *SacI*, *NcoI*, *NdeI*: Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen, *T7 Promotor*: T7 Promotorsequenz, *pBR322 Origin*: Replikationsursprung des Vektors pBR322, *bla*: kodierende Sequenz des Enzyms  $\beta$ -Lactamase (hierdurch vermittelte Ampicillinresistenz), *f1 Origin*: Replikationsursprung des filamentösen Phagen f1.

## 2.2.3 pET22b-ΔsGFP-HaloTag-MP/myc

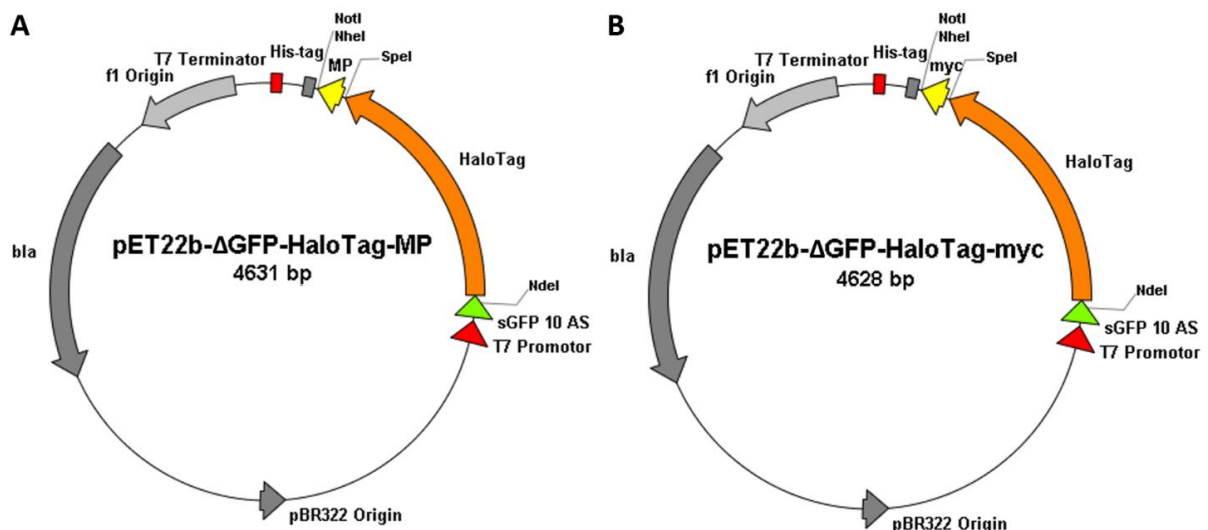


Abbildung 2.3: Genetische Karte der Plasmide pET22-ΔsGFP-HaloTag-MP und pET22-ΔsGFP-HaloTag-myc. Die funktionelle Orientierung der genetischen Elemente wird durch die Pfeilrichtung angegeben. *T7 Terminator*: T7 Terminatorsequenz, *His-tag*: kodierende Sequenz des hexa-Histidin-tags, *MP*: kodierende Sequenz des Mimiproteins oMCoT-II (A), *myc*: kodierende Sequenz des Mimiproteins oMCoT-II mit Austausch der inhibitor Loop Sequenz, gegen die Sequenz des c-myc Epitops (B), *HaloTag*: kodierende Sequenz des HaloTag® Proteins (Promega), *NotI*, *NheI*, *SpeI*, *NdeI*: Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen, *sGFP 10 AS*: die ersten 10 Aminosäuren der kodierende Sequenz des *red shifted green fluorescent protein*, *T7 Promotor*: T7 Promotorsequenz, *pBR322 Origin*: Replikationsursprung des Vektors pBR322, *bla*: kodierende Sequenz des Enzyms  $\beta$ -Lactamase (hierdurch vermittelte Ampicillinresistenz), *f1 Origin*: Replikationsursprung des filamentösen Phagen f1.

### Tabelle 2.1: Liste der verwendeten Oligonukleotide

Oligonukleotide	Sequenz
Amino-universal-up	5'[AminoC6T] TCCCGCGAAATTAATACGAC 3'
Dual-Biotin-universal-up	5' Biotin-Biotin-C18 Spacer-TTCCCGCGAAATTAATACGAC 3'
HaloTag-ende-up	5' ACCCCAGGCGTTCTGATCCC 3'
HaloTag-SOE-lo	5' CACCCCATACTAGTGCCGGAAATC 3'
MP-Bib-10	5' GAGATTTCCGGCACTAGTATGGGGTGCNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSN SNNSTGCCGTCGTGACTCCGATTG 3'
MP-Bib-6	5' GAGATTTCCGGCACTAGTATGGGGTGCNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSN GACTCCGATTG 3'
MP-Bib-8	5' GAGATTTCCGGCACTAGTATGGGGTGCNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSN CGTCGTGACTCCGATTG 3'
MP-lo-(Flc)	5' [Flc] TTTTTTTCAGGATTTTCGGGCACAT 3'
MP-NheI-lo	5' ACCGCTAGCGCCGCAGTAACCG 3'
MP-screen-up	5' ATGTGCCCGAAAATCCTG 3'
myc-lo-(Cy5)	5' [Cy5] AGATCCTCTTCTGAGATGAGTT 3'
myc-screen-up	5' GAACAAAACTCATCTCAG 3'
NdeI-sGFP10AS-HaloTag-up	5' TATACATATGAGCAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGAAATCGGTACAGGCTTT CCA 3'
pET22-lo-univ-up	5' TCCCGCGAAATTAATACGAC TTAATGCGCCGCTACAGG 3'
pET22-univ-up	5' TCCCGCGAAATTAATACGAC CCCC GCCAGCCTAGCCG 3'
pET22-up-univ-lo	5' GCTGGAGCTCTGCAGCTA CCCC GCCAGCCTAGCCG 3'
pET-universal-lo	5' GCTGGAGCTCTGCAGCTA TTAATGCGCCGCTACAGG 3'
pET-universal-up	5' TCCCGCGAAATTAATACGAC GATATAGGCGCCAGCAACC 3'
sGFP-ende-up	5' CCTGTGACACAATCTGC 3'
T7-Terminator-lo	5' TATGCTAGTTATTGCTCAG 3'
universal-lo	5' GCTGGAGCTCTGCAGCTA 3'
univ-lo-Amino-ori-lo	5' CGTAAGCCGGTACTGATTGA GCTGGAGCTCTGCAGCTA 3'
univ-up-Amino-ori-lo	5' CGTAAGCCGGTACTGATTGATCCCGCGAAATTAATACGAC 3'

Die DNA Längenstandards wurden nach Herstellerangaben vorbereitet und verwendet.

Für diesen Marker wurde Lambda DNA vollständig mit der Restriktionsendonuklease *Eco47I* verdaut und gereinigt. Die hierbei entstandenen 36 definierten Fragmente haben folgende

Längen in Basenpaaren: 8126, 6555, 6442, 3676, 2606, 2555, 2134, 2005, 1951, 1611, 1420, 1284, 985, 974, 894, 597, 590, 513, 511, 433, 398, 345, 310, 308, 272, 242, 215, 151, 88, 73, 67, 45, 42, 32, 29, 23.

*OGeneRuler™ Ultra low Range DNA Ladder* (Fermentas)

Der Marker enthält ein Gemisch aus 11 DNA Fragmenten, die mittels Chromatographie gereinigt wurden. Die einzelnen Fragmente haben folgende Längen in Basenpaaren: 300, 200, 150, 100, 75, 50, 35, 25, 20, 15, 10.

*2-Log DNA Ladder* (0.1-10.0 kb) (New England Biolabs)

Für diesen Marker wurden mehrere Plasmide mit geeigneten Restriktionsendonukleasen verdaut und gereinigt. Die verwendeten 19 Fragmente haben folgende Längen in Basenpaaren: 10002, 8001, 6001, 5001, 4001, 3001, 2017, 1517, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500/517, 400, 300, 200, 100.

*Unstained Protein Molecular Weight Marker, #SM0431* (Fermentas)

Der Marker stellt ein Gemisch aus 7 verschiedenen, gereinigten Proteinen dar und dient zur Molekulargewichtsabschätzung von Proteinen im Polyacrylamidgel. Zur Visualisierung müssen die Proteine im Anschluss an eine Elektrophorese mit Coomassie Brilliantblau R 250 gefärbt werden. Die enthaltenen Proteine haben folgende Molekulargewichte in kDa: 116, 66, 45, 35, 25, 18, 14.

*PageRuler™ Prestained Protein Ladder, #SM0671* (Fermentas)

Der Marker stellt ein Gemisch aus 10 verschiedenen, gereinigten Proteinen dar und dient zur Molekulargewichtsabschätzung von Proteinen im Polyacrylamidgel bzw. Western Blot. Die enthaltenen Proteine haben folgende Molekulargewichte in kDa: 170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15, 10.

## 2.5 Chemikalien

Tabelle 2.2: Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
ABIL WE09	Evonik Industries AG, Essen
Aceton	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Agarose NEEQ Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ammoniumglutamat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ammoniumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Int. Biotechnologies Inc. New Haven (USA)
Ampicillin-Dinatriumsalz	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Bacillol plus	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Brillantblau R 250	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Chloroform	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Coenzym A, Natriumsalz	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Diethylether	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Dikaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ethanol, 96 % (v/v)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Applchem GmbH, Darmstadt
Folinsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Folsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Formamid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

Glycerin	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Harnstoff	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Imidazol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Kaliumacetat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Kaliumglutamat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Magnesiumacetat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Magnesiumglutamat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Mineralöl	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumacetat	Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgien
Natriumcarbonat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Natriumoxalat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumpyruvat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Nickelchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Nicotinamadenindinukleotid (NAD)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Paraffinöl	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Pepton	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

Phenol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phosphoenolpyruvat (PEP)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Piperidin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Putrescin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Salzsäure, mind. 37 %, rauchend	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Spermidin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Stickstoff flüssig	TU Darmstadt
Streptomycinsulfat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tegosoft DEC	Evonik Industries AG, Essen
TEMED	Merck KGaA, Darmstadt
Tetracyclin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Tris-Acetat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Triton-X 100	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Trypton	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
TWEEN 20	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Xylencyanol-FF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

## 2.6 Lösungen und Puffer

Tabelle 2.3: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen

Lösungen und Puffer	Substanz	Konzentration
Ammoniumacetat-Stammlösung	NH <sub>4</sub> Ac	7 M
Ampicillin-Stammlösung	Ampicillin (Na-Salz)	100 mg/ml
AP-Reaktionspuffer	Tris-HCl (pH 9,0)	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl <sub>2</sub>	50 mM
APS-Stammlösung	APS	10 % (w/v)
BCIP-Stammlösung	BCIP	50 mg/ml
	in 70 % (v/v) Dimethylformamid	
Binding-Puffer	Tris-HCl (pH 7,5)	5 mM
	NaCl	1 M
	EDTA	0,5 mM

Breaking-Puffer	Tris-HCl (pH 7,5)	10 mM
	Triton-X 100	1 % (v/v)
	SDS	1 % (v/v)
	NaCl	100 mM
	EDTA	1 mM
Chloramphenicol-Stammlösung	Chloramphenicol in 96 % Ethanol	25 mg/ml
Coomassie-Färbelösung	Eisessig	20 % (v/v)
	Brillantblau R-250 in Methanol	0,2 % (w/v)
Emulsionsöl	ABIL WE09	7 % (w/v)
	Mineralöl	20 % (v/v)
	Tegosoft DEC	73 % (v/v)
Formamidfarbmarker	Bromphenolblau	0,05 % (w/v)
	Xylencyanol-FF	0,05 % (w/v)
	SDS	0,05 % (w/v)
	EDTA	0,1 mM
	D-Saccherose in Formamid	gesättigt
HOECHST-Puffer	Harnstoff	8 M
	Tris-Base	200 mM
	DTT	200 mM
	SDS	2 % (w/v)
Hybridisierungs-Puffer, 5	Tris-HCl (pH 9,5)	75 mM
	MgCl <sub>2</sub>	33,5 mM
	Formamid	25 % (v/v)
IMAC-Puffer	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 8,0)	100 mM
	NaCl	100 mM
Kanamycin-Stammlösung	Kanamycin	75 mg/ml
Konjugationspuffer	NaCO <sub>3</sub> /Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (pH 8,7)	0,1 M
Laufpuffer	Tris-HCl	25 mM
	Glycin	200 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
NBT-Stammlösung	NBT	75 mg/ml
	in 70 % (v/v) Dimethylformamid	



PBS	NaCl	140 mM
	KCl	10 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,4 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM
PBS-T Puffer	Tween 20	0,05 % v/v
	in PBS-Puffer	
S30-A Puffer	Tris-Acetat (pH 8,2)	10 mM
	Mg <sup>2+</sup> Acetat	14 mM
	KCl	0,6 mM
	2-Mercaptoethanol	6 mM
	sterilfiltriert	
S30-B Puffer	Tris-Acetat (pH 8,2)	10 mM
	Mg <sup>2+</sup> Acetat	14 mM
	KCl	0,6 mM
	DTT	1 mM
	PMSF	0,1 mM
	sterilfiltriert	
S30-C Puffer	Tris-Acetat (pH 8,2)	10 mM
	Mg <sup>2+</sup> Acetat	14 mM
	K <sup>+</sup> Acetat	0,6 mM
	DTT	0,5 mM
sGFP-Puffer	Tris-HCl (pH 8,0)	20 mM
	NaCl	150 mM
Sucrosefarbmarker	D-Saccharose	60 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
	Xylencyanol-FF	0,1 % (w/v)
	in TAE Puffer	
T7 Dialysepuffer	Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
	NaCl	10 mM
	EDTA	1 mM
	DTT	1 mM
T7 Puffer	Tris-HCl (pH 8,0)	30 mM
	NaCl	50 mM
	EDTA	10 mM
	Glycerol	5 % (v/v)
	2-Mercaptoethanol	10 mM

---

TAE-Puffer	Tris-Acetat	2 M
	EDTA	50 mM
TBE-Puffer	Tris-HCl (pH 7,4)	89 mM
	Borsäure	89 mM
	EDTA	2,5 mM
Taq-Puffer	Tris-HCl (pH 8,0)	100 mM
	KCl	500 mM
	MgCl <sub>2</sub>	25 mM
	Triton-X 100	5 % (v/v)
TE-Puffer	Tris-HCl (pH 7,5)	10 mM
	EDTA	1 mM
Tetracyclin-Stammlösung	Tetracyclin	12,5 mg/ml
	in 96 % Ethanol	
TK-Puffer	Tris-HCl (pH 8,4)	20 mM
	KCl	50 mM
Transferpuffer	Tris-HCl (pH 8,0)	20 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20 % (v/v)

---

## 2.7 Nährmedien

### dYT Medium

1 % (w/v) Hefeextrakt, 1,6 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) NaCl

### LB Medium

0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) NaCl

### YTPG Medium

22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 40 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM Glucose, 1,6 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) NaCl

Die Nährmedien wurden nach dem Ansetzen 20 min bei 120 °C zur Sterilisation autoklaviert. Für feste Medien wurde vor dem Autoklavieren 1,5 - 2 % Agar hinzugefügt. Antibiotika wurden aus den entsprechenden 1000-fach konzentrierten Stammlösungen einer Endkonzentration von

25 mg/l für Chloramphenicol, 100 mg/l für Ampicillin, 12,5 mg/l für Tetracyclin bzw. 75 mg/l für Kanamycin zugegeben.

## 2.8 Enzyme, Proteine und Nukleinsäuren

Tabelle 2.4: Liste der verwendeten Enzyme, Proteine und Nukleinsäuren

Enzyme, Proteine und Nukleinsäuren	Hersteller
Anti-cMyc-Epitop IgG (monoklonal, Maus)	Arbeitskreis Prof. Dr. P. Friedl, TU Darmstadt
Anti-Maus IgG alkalische Phosphatase (polyklonal, Ziege)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Anti-Sendai-Epitop IgG (monoklonal, Maus)	H. Einberger und H.P. Hofschneider, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes, Espoo, Finland
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
T7-RNA-Polymerase	Arbeitskreis Dr. F. Bernhard, Goethe-Universität, Frankfurt
Taq-DNA-Polymerase	Arbeitskreis Prof. Dr. H. Kolmar, TU Darmstadt
Unstained Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Prestained Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
OGeneRuler™ DNA Ladder, Ultra Low Range	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
OGeneRuler™ 100bp DNA Ladder	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Lambda DNA/Eco471 (AvaII) Marker, 13	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Oligodesoxyribonukleotide	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
	Purimex, Grebenstein
2-Log DNA Ladder (0.1-10.0 kb)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt

## 2.9 Kits

Tabelle 2.5: Liste der verwendeten Kits

Produkt	Hersteller
<i>BCA™ Protein Assay</i>	Thermo Scientific, USA
<i>CloneJET™ PCR Cloning Kit</i>	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>Phusion™ High-Fidelity PCR Kit</i>	Finnzymes, Espoo, Finland
<i>Wizard® Plus SV Midipreps DNA Purification System</i>	Promega, Madison, USA
<i>Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System</i>	Promega, Madison, USA
<i>Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System</i>	Promega, Madison, USA

## 2.10 Geräte und sonstige Materialien

Tabelle 2.6: Liste der verwendeten Geräte und sonstigen Materialien

Geräte und Materialien	Hersteller
Autoklav, Varioklav	Thermo Electron GmbH, Heidelberg
Autoklav, V-150	Systec GmbH, Wetztenberg
Autoklav, HAST-4-5-6	Zirbus technology GmbH, Bad Grund
Akta Basic UV900 P900 Frac 900, Unicorn 3.1 Software	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Basic Meter, pH-Meter	Sartorius AG, Göttingen
BD Accuri C6 flow cytometer (FAC)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Biologische Sicherheitswerkbank <i>LaminAir</i> HLB 2460 BS	Heraeus Holding GmbH, Hanau
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank	Heraeus Holding GmbH, Hanau
CertomatR BS-1 (Inkubationsschüttler)	Sartorius AG, Göttingen
Dialysiermembranschläuche, ZelluTrans	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Dynabeads® Streptavidin Trial Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Eismaschine	Ziegra, Stockport, England
Elektrophoresis Power Supply EPS 301 und 601	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Elektroporationskuvetten	BioRad, München
Elisareader, GENios™	Tecan Group Ltd., Mannedorf, Schweiz
Feinwaage, Sartorius Universal U4800P	Sartorius AG, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop AX 10	Carl Zeiss, Oberkochen
<i>French Pressure Cell Press</i>	SLM Instruments, Inc, Urbana, USA
GelDokumentationssystem, <i>Gel Jet Imager</i>	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Gene Pulser® und Pulse Controller	BioRad, München
Glaswaren	SCHOTT AG, Mainz
Herafreezer, - 80 °C Gefrierschrank	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Hoefer™ DualGel Caster	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
IKA® Ultra Turrax® Tube Disperser	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen

Kühlschrank	Liebherr, Biberach an der Riß
Magnetrührer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Microliterpipetten	Gilson, Middleton, USA
Mikrotiterplatten 96-well (flach, schwarz)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Mikrotiterplatten 96-well (flach, transparent)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Mikrowelle, Microstar® MD6459	MTC-Medion, Mühlheim
Nanodrop BioSpec	Shimadzu, Deutschland GmbH, Duisburg
Nitrozellulose-Membranen (0,45 µm)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Parafilm® "M" Laboratory Film	American National Can., Chicago, USA
PCR-Gefäße, <i>Multiply</i> R -µStrip 8er-Kette	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht
PCR-Maschinen	Eppendorf, Hamburg/BioRad, München
Petrischalen, 92x16 mm und 150x20 mm	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht
Pipettierhilfe, Pipetus R -Akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Quarzküvetten	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim
Reagiergefäß 1,5mL/2mL	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht
Röhrchen 15mL/50mL	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht
Schüttler, Lab-Shaker/Lab-Therm	Adolf Kühner AG, Birsfelden, Schweiz
Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät Branson Sonifier W-250	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Vortex® Genie 2	Bender & Hobein GmbH Labortechnik Chemikalien, Bruchsal
Waage, PM 4600	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Waage, Universal	Sartorius AG, Göttingen
Wasseraufbereitungsanlage, MilliQ-Synthesis A10	Merck KGaA, Darmstadt
Zentrifuge, (Kühlzentrifuge) Eppendorf 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, (Kühlzentrifuge) Multifuge 3 L-R	Eppendorf, Hamburg

---

Zentrifuge, (Kühlzentrifuge) Sigma 3K30

Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Zentrifuge, (Kühlzentrifuge) Sigma 6K15

Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Zentrifuge, Heraeus Megafuge 1.0

Heraeus Holding GmbH, Hanau

---

---

## 3 Methoden

---

### 3.1 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

#### 3.1.1 Vorbehandlung der Geräte und Lösungen

Die verwendeten hitzebeständigen Geräte wurden durch Erhitzen für 20 min auf 181 °C sterilisiert. Hitzeunbeständige Geräte wurden mit 70 %-igem (v/v) Ethanol desinfiziert. Hitzestabile Lösungen wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Hitzelabile Lösungen oder Lösungsbestandteile wurden unter Verwendung von Membranfiltern mit einer Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert und anschließend der sterilen Lösung zugegeben.

#### 3.1.2 Kultivierung von Bakterienstämmen

Alle verwendeten *E. coli*-Stämme wurden, soweit nicht anders angegeben, bei 37 °C und 160 U/min in dYT-Medium kultiviert. Um die genetische Stabilität zu gewährleisten wurden die Medien mit den für die jeweiligen vorhandenen Resistenzen entsprechenden Antibiotika komplettiert. Die Zelldichte der Kulturen wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD<sub>600</sub>) mittels UV-Vis Spektrometer bestimmt. Bei einer OD<sub>600</sub> über 1 wurden Verdünnungen der Zellen hergestellt, und die Zelldichte unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors errechnet.

#### 3.1.3 Lagerung von Bakterienstämmen

Zur Langzeitlagerung von *E. coli* wurden diese nach Zugabe von 10 % (v/v) DMSO als Gefrierkulturen bei – 80 °C gelagert. Zur kurzfristigen Lagerung von *E. coli* wurden diese auf LB-Agarplatten kultiviert, und bei 4 °C wenige Wochen gelagert.

#### 3.1.4 Herstellung elektrisch kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung elektrisch kompetenter *E. coli* XL-1 Blue (modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989) wurde eine Kultur in 50 ml dYT-Medium kultiviert. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,5 wurden die Zellen durch Zentrifugation (Hettich-Kühlzentrifuge, 4 000 Upm, 15 min, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt, und das Zellsediment in 50 ml, sterilem Wasser (0 °C) resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt, wobei beim zweiten Mal in 25 ml, beim dritten Mal in 12,5 ml sterilem Wasser (0 °C) resuspendiert wurde. Nach der

---

letzten Zentrifugation wurden die Zellen in 100-300 µl sterilem Wasser (0 °C) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde zu je 100 µl aliquotiert, mit 10 % (v/v) DMSO versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 3.1.5 Transformation von *E. coli* Zellen mittels Elektroporation

Zur Elektroporation (Dower *et al.*, 1988) wurden ca. 100 µl der vorbereiteten Suspension kompetenter Zellen mit der DNA-Lösung versetzt, und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Bio-Rad) mit 0,2 cm Plattenabstand überführt. Die Transformation der Zellen mittels Elektroporation erfolgte durch Anlegen eines Spannungspulses (2500 V, 25 µF, 200 Ω) durch den *Gene Pulser* (Bio-Rad). Unmittelbar nach dem Auslösen des Pulses wurde dem Transformationsansatz 1 ml steriles dYT-Medium zugegeben, eine Stunde bei 37 °C kultiviert und anschließend auf LB-Agarplatten mit zugesetzten Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

## 3.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

### 3.2.1 Extraktion von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Extraktion von Plasmid-DNA aus rekombinanten *E. coli* Zellen wurde mit dem *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen wurde das UV-Vis Spektrometer BioSpec-nano (Shimadzu) verwendet. Neben der Konzentration von doppelsträngigen Nukleinsäuren konnte auch die Konzentration einzelsträngiger Oligonukleotide mit diesem Gerät bestimmt werden.

### 3.2.3 Elektrophorese von Nukleinsäuren

#### 3.2.3.1 Elektrophorese von Nukleinsäuren im Agarosegel

Zur Analyse von Nukleinsäuren im Agarosegel wurde je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente 0,8-2 % (w/v) Agarose durch eErhitzen in TAE-Puffer gelöst. Vor der Verwendung wurde der Agaroselösung zum Anfärben der Nukleinsäuren 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Das Gel wurde nun in eine Gelkammer (100 x 70 x 0,5 mm) gegossen und ein



---

Zahnkamm eingesetzt. Nach Erstarren des Gels wurde dieses mit TAE-Puffer überschichtet, und der Zahnkamm entfernt. In die durch den Zahnkamm entstandenen Taschen wurden nun die mit mindestens 1/6 Vol. Sucrorefarbmater versetzten Nukleinsäureproben aufgetragen. Anschließend wurde eine Gleichspannung von 100 V angelegt, wobei die Dauer der Elektrophorese von der Agarosekonzentration des Gels sowie der erwarteten Größe der Nukleinsäuren abhängig ist. Die Nukleinsäuren wurden bei 324 nm im Durchlicht analysiert.

### 3.2.3.2 Elektrophorese von Nukleinsäuren im Polyacrylamidgel

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Nukleinsäuren oder Oligonukleotiden unter denaturierenden Bedingungen wurde die Elektrophorese in einem 7 M Harnstoff enthaltenen Polyacrylamidgel durchgeführt (Maniatis *et al.*, 1975).

Die Gele (7 M Harnstoff, 12 % v/v Acrylamid, 2 % v/v Bisacrylamid, 0,01 % w/v APS, 0,1 % v/v TEMED in TBE-Puffer) wurden jeweils einzeln mit dem Mini-PROTEAN® Tetra Cell System (BioRad) hergestellt oder in 20 cm x 20 cm x 2 mm Gelapparaturen gegossen. Nach Abschluss der Polymerisation wurden die Gele in eine Elektrophoresekammer gespannt und diese mit TBE-Puffer befüllt. Die zu untersuchenden Nukleinsäureproben wurden vor dem Gelauftrag mit 2 Volumen Formamid versetzt, 10 min bei 90 °C inkubiert, Sucrorefarbmater zugegeben, und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde entweder bei 30 mA (für Minigele) oder bei 20 Watt Gleichspannung durchgeführt.

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele 10 min in 10 µg/ml Ethidiumbromidlösung gefärbt, 10 min in Wasser entfärbt, und bei 324 nm im Durchlicht analysiert.

### 3.2.4 Reinigung und Gelextraktion von Nukleinsäuren

Zur Isolierung von Nukleinsäuren aus einem Agarosegel wurden die gewünschten Banden unter möglichst kurzer UV-Belichtung aus der Gelmatrix ausgeschnitten. Die anschließende Gelextraktion erfolgte mit dem *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) nach Angaben des Herstellers. Zur Reinigung von Nukleinsäuren wurde ebenfalls das *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) nach Angaben des Herstellers verwendet.

### 3.2.5 Phenol-Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Zur Entfernung von Proteinen aus einer DNA-Lösung wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt (Mülhardt, 1999). Die DNA-Lösung wurde mit einem Volumen TE-gesättigtem Phenol versetzt, gründlich gemischt, ein gleicher Anteil an Chloroform zugesetzt und erneut gemischt. Um die Phasenbildung zu beschleunigen, wurde der Ansatz zentrifugiert (14 000 U/min, 1 min, 23 °C). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem gleichen Anteil an Chloroform gemischt. Anschließend wurde das Gemisch zentrifugiert (23 °C, 14 000 U/min, 1 min) und die obere DNA enthaltende wässrige Phase wurde abgenommen.

### 3.2.6 Fällung der DNA aus wässrigen Lösungen

#### 3.2.6.1 Fällung der DNA mit Ammoniumacetat und Ethanol

Die DNA-Lösung wurde mit einem Zehntel des Volumens der DNA-Lösung an 7 M Ammoniumacetat, sowie dem dreifachen Volumen an 96 %igen (v/v) Ethanol versetzt, mindestens 30 min bei -20 °C gefällt und anschließend in der Kühltzentrifuge sedimentiert (15 000 U/min, 30 min, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen und das DNA-Sediment bei 37 °C getrocknet um Ethanolrückstände zu entfernen. Das getrocknete DNA-Sediment wurde in Wasser solubilisiert.

#### 3.2.6.2 Fällung der DNA mit Natriumacetat und Isopropanol

Die DNA-Lösung wurde mit einem Zehntel des Volumens der DNA-Lösung an 3 M Natriumacetat, sowie einem Volumen an Isopropanol versetzt und anschließend in der Kühltzentrifuge sedimentiert (15 000 U/min, 30 min, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen, und das DNA-Sediment mit 1 ml 75 % v/v Ethanol (-20°C) gewaschen. Hiernach wurde die DNA erneut in der Kühltzentrifuge sedimentiert (15 000 U/min, 20 min, 0 °C). Der Überstand wurde abgenommen und das DNA-Sediment bei 37 °C getrocknet um Ethanolrückstände zu entfernen. Das getrocknete DNA-Sediment wurde in Wasser aufgenommen.

### 3.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die *polymerase chain reaction* (PCR) (Saiki *et al.*, 1985, Mullis & Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988) ist eine *in vitro* Methode zur exponentiellen Amplifikation spezifischer Nukleinsäuresequenzen mittels hitzestabiler DNA-abhängiger DNA-Polymerasen. Im ersten

Schritt wird die doppelsträngige DNA-Matrize durch Hitzedenaturierung in einzelsträngige DNA überführt. Ein Absenken der Temperatur sorgt im zweiten Schritt zur Anlagerung zweier spezifischer Oligonukleotid-Primer entgegengesetzter Orientierung. Im dritten Schritt werden die Primer bei hoher Temperatur mit Hilfe einer thermostabilen Polymerase komplementär zur DNA-Matrize verlängert. Durch mehrfache Wiederholung der Denaturierungs-, Hybridisierungs- und Elongationsschritte wird die DNA-Matrize exponentiell amplifiziert. Da die verkürzten neu synthetisierten DNA-Moleküle in dem jeweils folgenden Zyklus als Matrize dienen, reichert sich die durch die beiden Primer flankierte DNA-Region spezifisch an.

Die PCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 50 µl durchgeführt. Ein Reaktionsansatz enthielt 5 bis 100 ng DNA-Matrize, 10 pmol eines jeden Primers, 0,2 mM dNTPs sowie 5 Einheiten einer rekombinanten *Taq* DNA-Polymerase in Taq-Puffer.

Ein Standard-PCR Protokoll wurde wie folgt definiert:

Tabelle 3.1: Standard PCR Protokoll.

Reaktion		Temperatur in °C	Zeitdauer in Minuten
initiale Denaturierung		94	4
30 Zyklen	Denaturierung	94	0,5
	Hybridisierung	primerspezifisch	0,5
	Elongation	72	0,5 – 1,5
finale Elongation		72	4

Um die Polymerase nicht unnötig zu schädigen, wurden die Denaturierungszeiten so gering wie möglich gewählt. Die Hybridisierungstemperatur kann nach der 2 + 4-Regel abgeschätzt werden. Hierbei rechnet man für jede A+T Paarung 2°C und für G+C 4°C. Als Ausgangspunkt sollte man die Hybridisierungstemperatur 5°C unter der abgeschätzten Hybridisierungstemperatur wählen. Häufig wurde eine Hybridisierungstemperatur von 52 °C gewählt. Die Elongationszeit richtet sich nach der Länge des PCR-Produkts wobei als Richtwert eine Syntheserate von 1 kb/min angenommen wird. Die finale Elongation dient der eventuell notwendigen Vervollständigung der Replikation.

### 3.2.7.1 PCR unter Verwendung einer *proofreading*-Polymerase

Um ein Produkt zu erhalten, das keine oder nur wenige Punktmutationen enthält, kann eine Polymerase mit einer *proofreading* Aktivität (3-5 Exonuklease Aktivität) verwendet werden.

Hierfür wurde die rekombinante Phusion® *High-Fidelity* DNA Polymerase (Finnzymes) verwendet, welche eine 50 fach höhere Genauigkeit gegenüber einer *Taq* DNA-Polymerase besitzt.

Die PCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 50 µl durchgeführt. Ein Reaktionsansatz enthielt 5 bis 100 ng DNA-Matrize, 25 pmol eines jeden Primers, 0,2 mM dNTPs sowie 0,5-1 Einheiten der Phusion® *High-Fidelity* DNA Polymerase in dem vom Hersteller mitgelieferten HF-Puffer.

Ein Phusion-PCR Protokoll wurde wie folgt definiert:

Tabelle 3.2: Phusion-PCR Protokoll.

Reaktion	Temperatur in °C	Zeitdauer
initiale Denaturierung	98	30 s
30 Zyklen	Denaturierung	98
	Hybridisierung	primerspezifisch
	Elongation	72
finale Elongation	72	10 min

Die Hybridisierungstemperatur wurde mit Hilfe des *Tm Calculator* auf der Webseite der Firma *New England BioLabs* berechnet. Die Elongationszeit richtet sich nach der Länge des PCR-Produkts wobei vom Hersteller eine Syntheserate von 15-30 s/kb angegeben wird.

### 3.2.7.2 Splicing by Overlap Extension PCR (SOE-PCR)

Zur Fusion zweier DNA Fragmente wurde die *SOE-PCR* durchgeführt. Hierfür wurden zunächst zwei DNA Fragmente mittels PCR unter Verwendung einer *proofreading*-Polymerase hergestellt, deren komplementäre Enden eine Sequenzidentität von 26 bp aufweisen. Um diese beiden DNA Fragmente zu fusionieren, wurde eine PCR ähnliche Reaktion durchgeführt. Ein 50 µl Reaktionsansatz enthielt je 0,04 bis 0,05 pmol der beiden zu fusionierenden DNA Fragmente, 0,2 mM dNTPs sowie 0,5-1 Einheiten der Phusion® *High-Fidelity* DNA Polymerase in dem vom Hersteller mitgelieferten HF-Puffer.

Die Fusionierungsreaktion wurde in einem PCR Gerät wie folgt durchgeführt:

Tabelle 3.3: SOE-PCR Protokoll.

Reaktion	Temperatur in °C	Zeitdauer
initiale Denaturierung	98	60 s
10 Zyklen	Denaturierung	98
	Hybridisierung	primerspezifisch
	Elongation	72
finale Elongation	72	3 min

Im Anschluss wurden jeder Reaktion 25 pmol eines jeden Primers in dem vom Hersteller der Polymerase mitgelieferten HF-Puffer zugefügt, und zur Amplifikation der fusionierten DNA eine PCR Reaktion wie in Abschnitt 3.2.7.1 beschrieben durchgeführt.

### 3.2.7.3 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist ein schnelles Nachweisverfahren für eine positive Transformation eines rekombinanten Plasmids in einem Bakterienstamm. Hierbei dienen anstelle von isolierter DNA Zellen einer Bakterienkultur als Matrize für die PCR.

Die zu untersuchenden Transformanten wurden von einer Agarplatte gepickt, eine neue Agarplatte mit ihnen beimpft und die verbleibenden Zellen in 25 µl Taq-Puffer überführt. Da für die Kolonie-PCR in der Regel offene Gefäße verwendet wurden, wurden die Ansätze mit 25 µl Paraffinöl überschichtet, um die Evaporation der Flüssigkeit während der Amplifikationszyklen zu verhindern. Dieser Ansatz wurde im PCR-Gerät für 4 min bei 98 °C erhitzt, um einen vollständigen Zellaufschluss zu gewährleisten. Anschließend wurden 10 pmol eines jeden Primers, 0,2 mM dNTPs sowie 5 Einheiten einer rekombinanten *Taq* DNA-Polymerase in Taq-Puffer in einem Volumen von 25 µl zugegeben, und die Amplifikation der DNA entsprechend einer Standard-PCR durchgeführt.

### 3.2.7.4 Einzelmolekül-PCR auf *microbeads* in Wasser-in-Öl-Emulsion

Die Einzelmolekül-PCR auf *microbeads* in Wasser-in-Öl-Emulsion oder kurz emPCR sowie deren Nachweis wurden in Anlehnung an die von Diehl *et al.* 2006 veröffentlichten Methode durchgeführt.

Hierfür wurden wurden 100 µl Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 ( $7-12 \times 10^8$ ) zweimal mit je 100 µl TK Puffer gewaschen. Die *microbeads* wurden in 100 µl TE Puffer mit 100 µM Biotin-Primer resuspendiert und gevortext. Zur Bindung der Primer an die *microbeads* wurden diese 30 min bei RT inkubiert und ca. alle 10 min durch Vortexen gemischt. Im Anschluss wurden die *microbeads* drei Mal mit je 100 µl TK Puffer gewaschen, im Anschluss in 100 µl TK Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Die emPCR wurde entweder in einem Reaktionsvolumen von 150 µl oder optimiert in einem Reaktionsvolumen von 1 ml angesetzt. Ein 150 µl Reaktionsansatz enthielt 6 µl der mit dem Biotin-Primer dekorierten *microbeads*, ~700 fM DNA-Matrize ( $\sim 6 \times 10^7$  Moleküle), 75 pmol des zweiten Primers, 0,2 mM dNTPs sowie 3 Einheiten der Phusion® *High-Fidelity* DNA-Polymerase in dem vom Hersteller erhältlichen detergenzfreiem HF-Puffer. Zur Herstellung der Wasser-in-

Öl-Emulsion wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß eine Stahlkugel mit 6 mm Durchmesser gegeben, 600 µl Emulsionsöl und anschließend der emPCR Ansatz von 150 µl zugegeben. Das Gefäß wurde fest verschlossen und die Wasser-in-Öl-Emulsion durch kräftiges Schütteln für 15 Sekunden generiert. Die Emulsion wurde zu je 50 µl auf PCR Reaktionsgefäße aufgeteilt, und die emPCR wie folgt durchgeführt:

Tabelle 3.4: emPCR Protokoll.

Reaktion		Temperatur in °C	Zeitdauer
initiale Denaturierung		98	60 s
30 Zyklen	Denaturierung	98	10 s
	Hybridisierung	65	30 s
	Elongation	72	90 s
finale Elongation		72	10 min

Zum Aufbrechen der Emulsion wurden zu je 50 µl Emulsion je 150 µl Breaking-Puffer gegeben, gemischt und die Ansätze in 1,5 ml Reaktionsgefäßen vereinigt. Zur Sedimentation bzw. Phasentrennung wurden die Ansätze 2 min zentrifugiert. Die Ölphase wurde soweit wie möglich entfernt und die *microbeads* zweimal mit je 1 ml Breaking-Puffer gewaschen. Die *microbeads* wurden in je 100 µl TK-Puffer aufgenommen, beide Ansätze vereinigt, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Zum Nachweis der emPCR wurde zunächst der nichtbiotinylierte DNA-Strang entfernt, der biotinylierte DNA-Strang mit einem fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid hybridisiert und im FAC analysiert. Hierzu wurden die *microbeads* in 500 µl 0,1 M NaOH Lösung 2 min inkubiert und in 100 µl TK-Puffer aufgenommen. Zur Hybridisierung wurden 20 µl *microbeads* in einem 100 µl Hybridisierungsansatz mit 100 nM fluoreszenzmarkiertem Oligonukleotid, MP-lo-(Flc) oder myc-lo-(Cy5), in 1 × Hybridisierungs-Puffer eingesetzt. Der Hybridisierungsansatz wurde 20 min bei 50 °C inkubiert, die *microbeads* drei Mal mit je 100 µl TK-Puffer gewaschen, mit 100 µl Wasser verdünnt und im FAC analysiert.

Bei der optimierten emPCR mit 1 ml Reaktionsvolumen wurden direkt die fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide zur Amplifikation verwendet. Ein 1 ml emPCR-Ansatz enthielt je 0,2 nmol der beiden fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide MP-lo-(Flc) und myc-lo-(Cy5), 0,2 mM dNTPs, ~60 fM ( $\sim 3,6 \times 10^7$  Moleküle) DNA-Matrize und 100 Einheiten einer rekombinanten *Taq* DNA-Polymerase in detergenezfreiem Taq-Puffer. Hiervon wurden 50 µl als Kontrolle

entnommen und zu den verbleibenden 950 µl emPCR-Ansatz 3 µl der mit dem Biotin-Primer dekorierten *microbeads* hinzugegeben.

Zur Herstellung der Wasser-in-Öl-Emulsion wurde der emPCR Ansatz zu 2 ml Emulsionsöl gegeben und im *Ultra-Turrax® Tube Drive controle* (IKA, Staufen) 5 min bei 4 000 U/min homogenisiert. Die hierbei entstandene Wasser-in-Öl Emulsion wurde zu je 80 µl auf PCR-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die 50 µl zu Kontrollzwecken entnommener emPCR-Ansatz wurden mit 10 pmol Dual-Biotin-universal-up Primer versetzt, mit Paraffinöl überschichtet und die emPCR wie folgt durchgeführt:

Tabelle 3.5: Optimiertes emPCR Protokoll.

Reaktion	Temperatur in °C	Zeitdauer
initiale Denaturierung	94	240 s
50 Zyklen	Denaturierung	94
	Hybridisierung	58
	Elongation	72
		10 s

Zum Aufbrechen der Emulsion wurden die emPCR-Ansätze zweimal mit je 80 µl Isopropanol pro Reaktionsgefäße gewaschen und die wässrigen Lösungen in 8 1,5 ml Reaktionsgefäßen vereinigt. Die *microbeads* wurden abwechselnd mit je 1 ml Isopropanol und 1 ml Breaking-Puffer gewaschen, bis die hydrophobe Phase vollständig entfernt war. Anschließend wurden alle *microbeads* vereinigt, dreimal mit je 100 µl TK-Puffer gewaschen und in 100 µl TK-Puffer aufgenommen.

### 3.2.8 Immobilisierung von Biotin markierter PCR-Produkte auf *microbeads*

5 µl Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 ( $3,5-6 \times 10^7$ ) wurden zweimal mit je 100 µl TK-Puffer und anschließend zweimal mit je 100 µl Binding-Puffer gewaschen und in 100 µl Binding-Puffer aufgenommen. 50 µl dieser *microbeads* wurden mit ca. 40 µl PCR-Reaktionsansatz 1 h bei RT inkubiert. Die *microbead* wurden dreimal mit je 100 µl TK-Puffer gewaschen, in 100 µl TK-Puffer aufgenommen, und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

### 3.2.9 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsspaltungen von DNA wurden jeweils unter den vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Temperaturbedingungen durchgeführt. Bei gleichzeitigem Verdau der DNA mit mehreren Restriktionsenzymen wurden die Pufferbedingungen entsprechend der höchst möglichen

---

Aktivität der jeweiligen Restriktionsendonukleasen gewählt. War ein Mehrfach-Verdau aufgrund abweichender Temperatur- oder Pufferanforderungen der jeweiligen Enzyme nicht möglich, so wurden die Restriktionsspaltungen einzeln und nacheinander durchgeführt.

### 3.2.10 Ligation von Nukleinsäuren

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer durchgeführt und für eine Stunde bei RT inkubiert. In der Regel wurden 2-10 Einheiten T4-DNA-Ligase in einem Endvolumen von 20-70 µl verwendet. Bei Ligation von DNA-Vektor-Fragment mit DNA-Insert-Fragment, wurde das DNA-Insert-Fragment in einem bis zu fünffachen molaren Überschuss zugegeben. Ligationen von etwa gleichgroßen DNA-Fragmenten wurden in einem äquimolaren Verhältnis durchgeführt.

### 3.2.11 Konjugation von Oligonukleotiden mit HaloTag®-Ligand

Für die Konjugation von Oligonukleotiden mit HaloTag®-Ligand wurden kommerziell erworbene, modifizierte Oligonukleotide (Sigma Aldrich oder PURIMEX) verwendet. Diese beinhalten eine Amin-Gruppe, die über einen C6 Linker mit dem 5' Ende des Oligonukleotides verbunden ist. Zur Konjugation wurde der HaloTag® Succinimidyl Ester (O4) Ligand verwendet. In der Regel wurden 9,5 nmol Amin modifiziertes Oligonukleotid mit 0,4 mg HaloTag® Succinimidyl Ester (O4) Ligand in Konjugationspuffer (0,1 M NaCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 8,7) eine Woche bei RT inkubiert.

### 3.2.12 Reinigung von Oligonukleotiden

Zur Reinigung von Oligonukleotiden wurden *Micro-Spin 6 Columns* (BioRad) verwendet. Hierzu wurden die Röhrchen nach Herstellerangaben in Wasser umgepuffert, und zur Reinigung von je 100 µl Konjugationsansatz verwendet. Im Anschluss wurde die DNA-Konzentration mit dem UV-Vis Spektrometer BioSpec-nano (Shimadzu) bestimmt.

## 3.3 Proteinchemische Arbeitsmethoden

### 3.3.1 Proteinexpression in *E. coli*

Zur Expression von Proteinen in *E. coli* wurden 0,4-1 l LB Medium mit 4-10 ml einer Übernachtskultur des jeweiligen Stammes inokuliert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und



---

160 U/min. Hierbei wurde die Zelldichte regelmäßig durch Messen der OD<sub>600</sub> überprüft. Falls erforderlich, wurde die Expression des Proteins durch Zugabe von 1 mM IPTG Endkonzentration bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 induziert. Die Proteinexpression erfolgte über 5 h. Im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugation (Hettich-Kühlzentrifuge, 4 000 U/min, 15 min, 4 °C) sedimentiert. Das Zellsediment wurde in dem, für den Verwendungszweck entsprechenden Puffer aufgenommen, und entweder direkt weiterverarbeitet, oder bei -80 °C gelagert.

### **3.3.2 Zellaufschluss**

#### **3.3.2.1 Aufschluss von *E. coli* Zellen mittels Sonifikation**

Für den Zellaufschluss wurde die Zellsuspension je 3 × 3 min mit dem Branson-Sonifier W250 (Leistungszyklus 50 %) auf Eis sonifiziert. Zur Abtrennung nicht aufgeschlossener Zellen und größerer Zellbestandteile wurde das Zelllysatz zentrifugiert (Sigma-Kühlzentrifuge, 15 000 U/min, 15 min, 4 °C.). Die restlichen, im Zelllysatz enthaltenen Partikel wurden durch Filtration entfernt (0,45 µm, Schleicher & Schüll).

#### **3.3.2.2 Aufschluss von *E. coli* Zellen mittels French® Press**

Für den Zellaufschluss im Hochdruckhomogenisator (French® Press) (French & Milner, 1955) wurde die Zellsuspension luftblasenfrei in die gekühlte (4 °C) Aufschlussbombe gefüllt. Die Bombe wurde in die French® Press eingespannt und ein Druck von 8,26 MPa (1200 *poundforce per square inch*) eingestellt. Das Zelllysatz wurde tröpfchenweise in einem auf Eis gekühlten Behälter aufgefangen. Um einen möglichst kompletten Zellaufschluss zu gewährleisten, wurde dieser Vorgang dreimal durchgeführt. Zur Abtrennung nicht aufgeschlossener Zellen und größerer Zellbestandteile wurde das Zelllysatz zentrifugiert (Sigma-Kühlzentrifuge, 15 000 U/min, 15 min, 4 °C.). Die restlichen, im Zelllysatz enthaltenen Partikel wurden durch Filtration entfernt (0,45 µm, Schleicher & Schüll).

### **3.3.3 Konzentration von Proteinlösungen mittels Ultrafiltration**

Zur Konzentration von Proteinlösungen wurden Vivaspin 15 Ultrafiltrationseinheiten (Sartorius, MWCO: 10 000) verwendet. Die Ultrafiltration erfolgte nach Angaben des Herstellers bis zum Erreichen der gewünschten Konzentration.

### 3.3.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen in wässrigen Lösungen wurde das UV-Vis Spektrometer BioSpec-nano (Shimadzu) verwendet. War eine photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration aufgrund der Eigenschaften des zu untersuchenden Proteins nicht möglich, wurde die Konzentrationsbestimmung mit dem *BCA<sup>TM</sup> Protein Assay* (Thermo Scientific, Karlsruhe) nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 3.3.5 Fluoreszenzmessung von sGFP haltigen Lösungen

Zur Bestimmung der Fluoreszenz von sGFP haltigen Lösungen wurde das GENios<sup>TM</sup> Detektionsgerät (Tecan Trading AG) verwendet. Die sGFP haltigen Lösungen wurden 1:100 in sGFP-Puffer verdünnt und je 300 µl in schwarze 96-Loch Mikrotiterplatten mit flachem Boden (Greiner) vorgelegt. Zur Nullpunktbestimmung wurden 300 µl sGFP Puffer verwendet. Die Extinktionswellenlänge wurde auf 485 nm, die Emissionswellenlänge auf 535 nm eingestellt. Die Integrationszeit betrug 40 µs, die Inkubationszeit 20 s, der Gain 60 und die Anzahl der Messungen 30.

### 3.3.6 Elektrophorese von Proteinen im Polyacrylamidgel

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer relativen Molekülmasse wurde die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) verwendet. Hierzu wurde das Trenngel (15 % v/v Acrylamid, 0,4 % v/v Bisacrylamid, 20 % v/v Trenngel-Puffer, 1% v/v SDS-Stammlösung, 0,5 % v/v APS-Stammlösung, 0,01 % v/v TEMED) unmittelbar nach Mischen der Komponenten in einen Gießstand (Hoefer *Scientific* SE 250) für 5 bis 10 Gele gegossen. Um ein Antrocknen zu verhindern, wurde das Trenngel nach dem Gießen bis zur vollständigen Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Das Isopropanol wurde durch Waschen mit Wasser vollständig entfernt, das Sammelgel (4,8 % v/v Acrylamid, 0,13 % v/v Bisacrylamid, 10 % v/v Sammelgel-Puffer, 1% v/v SDS-Stammlösung, 0,5 % v/v APS-Stammlösung, 0,2 % v/v TEMED) eingefüllt und ein Taschenkamm eingesetzt. Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurde das Gel in die Laufkammer eingespannt und mit Laufpuffer überschichtet. Die Proben wurden mit ca. 1/5 des Volumens HOECHST-Puffer versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert und reduziert. Zur Abschätzung der molekularen Masse der Proteine wurde, neben den Proben, ein Proteingrößenmarker aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 30 mA für

---

ca. 1,5 h, bis zum Durchlauf der Farbmarkerbande, durchgeführt. Anschließend wurden die im Gel befindlichen Proteine mittels Coomassie-Färbung visualisiert, oder mittels Western-*Blot* auf eine Nitrocellulosemembran übertragen.

### 3.3.7 Coomassie-Färbung von Proteinen im Polyacrylamidgel

Zur Visualisierung von Proteinen in einem Polyacrylamidgel wurde dieses mit Coomassie Serva Blau G-250 (modifiziert nach Zehr *et al.* 1989) angefärbt. Hierzu wurde das Gel für mindestens 30 min in Coomassie-Färbelösung bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Um überschüssigen Farbstoff zu entfernen, wurde das Gel mit Wasser oder Entfärbelösung gewaschen und zum Beschleunigen des Vorgangs in der Mikrowelle erhitzt. Zur Dokumentation wurde das gefärbte Gel auf einem Leuchttisch fotografiert (Gel Jet Imager, INTAS/Göttingen).

### 3.3.8 Immunologische Detektion von Proteinen mittels Western-*Blot* Analyse

Die durch SDS-PAGE (3.3.6) aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe des Western-*Blot* Verfahrens (Towbin *et al.*, 1979, Swanson *et al.*, 1982) aus der Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Gel verlaufendes elektrisches Feld eluiert, und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Hierfür wurde das Gel, die Nitrocellulosemembran sowie die für den Transfer verwendeten Filterpapiere (Whatmann) in Transferpuffer eingelegt. Für den Transfer wurde die „Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell“ Apparatur (Bio-Rad, München) verwendet. Der Proteintransfer wurde bei konstanten 10 V und maximaler Stromstärke für 1 h durchgeführt. Nach Beendigung des Proteintransfers wurden die freien Bindestellen der Nitrocellulosemembran durch Inkubation mit 3 % Milchpulver in PBS für mindesten 2 h abgesättigt. Im Anschluss wurde die Membran drei Mal in PBS-T Puffer (0,05 % Tween<sup>®</sup> 20 in PBS) gewaschen und mit dem primär Antikörper in 1,5 % Milchpulver in PBS für mindestens 1 h bei RT geschüttelt. Um nicht gebundene Antikörpermoleküle zu entfernen, wurde die Membran drei Mal mit PBS-T Puffer gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran mit dem mit alkalischer Phosphatase konjugiertem sekundären Antikörper (anti-Maus Antikörper in PBS Puffer) für mindesten 1 h bei RT inkubiert. Die Membran wurde erneut drei Mal mit PBS-T Puffer gewaschen und kurz mit Wasser gespült, um das im PBS Puffer enthaltene Phosphat zu entfernen. Zur Visualisierung der Antikörperbindung erfolgte eine Inkubation mit einem chromogenen Substrat für alkalische Phosphatase (Leary *et al.*, 1983). Hierzu wurde die

---

Membran in 25 ml alkalische Phosphatase-Puffer mit 12,5 µl NBT-Stammlösung und 70 µl BCIP-Stammlösung bis zur gewünschten Intensität der Färbung inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen, wurde die Membran in Wasser überführt. Zur Dokumentation wurde die Membran an der Luft getrocknet und eingescannt.

### 3.3.9 Säulenchromatographische Methoden

#### 3.3.9.1 Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC)

Zur Isolierung von Proteinen, die einen Polyhistidin-*tag* beinhalten wurde eine immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie durchgeführt. Als Säulenmaterial wurde *Chelating Sepharose™ Fast Flow* (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Säule wurde mit einem Bettvolumen von 2 ml gefüllt, und anschließend mit 5 Säulenvolumen 100 mM NiCl<sub>2</sub> Lösung beladen. Die Säule wurde mit mindestens 5 Säulenvolumen IMAC Puffer equilibriert, und das sterilfiltrierte Zelllysate aufgetragen (3.3.2). Um unspezifisch gebundene Proteine zu eluieren, wurde die Säule mit mindestens 5 Säulenvolumen IMAC Puffer gewaschen. Im Anschluss wurde das Zielprotein stufenweise mit jeweils 5 Säulenvolumen 20, 40, 80, 200 und 500 mM Imidazol in IMAC Puffer von der Säule eluiert und separat aufgefangen. Die Säule wurde im Anschluss durch Waschen mit 10 Säulenvolumen 1 M Imidazol in IMAC Puffer regeneriert und bis zur weiteren Verwendung in 20 % Ethanol im Kühlschrank gelagert. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und gewünschte Fraktionen vereinigt. Um das in der Proteinlösung enthaltene Imidazol zu entfernen, wurde die Proteinlösung gegen den gewünschten Puffer dialysiert. Nicht sofort weiter verwendete Proteinlösungen wurden bei 4 °C gelagert.

#### 3.3.9.2 Anionenaustauschchromatographie

Zur Isolierung von T7 RNA Polymerase wurde eine Anionen Austauschchromatographie durchgeführt. Hierfür wurde ein FPLC Äkta Basic Modell mit einer Q Sepharose Säule mit 10 ml Säulenvolumen verwendet. Die Säule wurde zunächst mit 10 Säulenvolumen T7 Puffer equilibriert, der Zellextrakt mit einer Flussrate von 1 ml/min geladen und die Säule mit 5 Säulenvolumen T7 Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte über einen kontinuierlichen Gradient von 50 mM bis 500 mM NaCl in 15 Säulenvolumen bei einer Flussrate von 3 ml/min. Der Zeitpunkt der Elution wurde durch Absorption bei 280 nm bestimmt. Die einzelnen Fraktionen wurden in Volumen von 1 ml gesammelt.

---

### 3.3.10 Dialyse von Proteinlösungen

Um unerwünschte niedermolekulare Stoffe (wie Salze oder Imidazol) aus einer Proteinlösung zu entfernen oder um einen Pufferwechsel durchzuführen, wurde eine Dialyse der Proteinlösung gegen den gewünschten Puffer durchgeführt. Hierzu wurde die Proteinlösung in einen, für das Zielprotein geeigneten, Dialyseschlauch (10 000-14 000 MWCO; Carl Roth GmbH und Co.KG) überführt. Die Dialyse erfolgte gegen das mindestens 250-fache Volumen des entsprechenden Puffers über Nacht bei 4 °C. Um eine möglichst komplette Umpufferung zu erhalten wurde während der Dialyse der Puffer ausgetauscht.

### 3.3.11 Kopplung von Antikörpern auf paramagnetische *microbeads*

Zur Kopplung von Antikörpern auf paramagnetische *microbeads* wurden Dynabeads® M-280 Streptavidin verwendet. Je 0,5 mg Dynabeads® M-280 Streptavidin wurden zweimal mit je 200 µl PBS gewaschen und mit 20 µl anti-Maus IgG Biotin-Konjugat Antikörpern in 1 ml PBS für 2 Stunden inkubiert. Die Dynabeads® M-280 Streptavidin wurden dreimal mit je 1 ml PBS gewaschen und anschließend für 2 Stunden mit 100 µl anti-myc oder anti-Sendai IgG Antikörpern in 1 ml PBS inkubiert. Die *microbeads* wurden fünfmal mit je 1 ml PBS gewaschen, in 200 µl PBS aufgenommen, und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert.

### 3.3.12 Nachweis von Antikörpern auf paramagnetischen *microbeads*

Die Kopplung von Anti-myc Antikörpern auf paramagnetische *microbeads* (Abschnitt 3.3.11) wurde über einen zweiten Anti-Maus IgG Antikörper nachgewiesen. Für den Nachweis wurden sowohl anti-myc IgG Antikörper präsentierende *microbeads*, als auch ausschließlich anti-Maus IgG Biotin-Konjugat Antikörper präsentierende *microbeads* als Negativkontrolle verwendet. 5 µl der *microbeads* wurden mit je 1 ml einer 1:500 Verdünnung von anti-Maus IgG alkalische Phosphatase-Konjugat Antikörper in PBS für 2 Stunden inkubiert. Die *microbeads* wurden 5 Mal mit je 1 ml PBS gewaschen und anschließend in 1 ml 1 mg/ml PNPP in AP-Reaktionspuffer resuspendiert. Nach Inkubation (1 min) wurde der Überstand abgenommen, und die Adsorption bei 405 nm bestimmt.

### 3.3.13 Immobilisierung von HaloTag Fusionsproteinen

#### 3.3.13.1 Immobilisierung von HaloTag Fusionsproteinen auf *HaloLink™ Magnetic Beads*

Zur Immobilisierung von HaloTag Fusionsproteinen auf *HaloLink™ Magnetic Beads* wurden 10 µl *HaloLink™ Magnetic Beads* fünf Mal mit je 50 µl sGFP Puffer gewaschen, in 50 µl sGFP Puffer resuspendiert und 30 min mit 100 µl der HaloTag Fusionsprotein enthaltenden Proteinlösung inkubiert. Im Anschluss wurden die *HaloLink™ Magnetic Beads* fünf Mal mit je 100 µl sGFP-Puffer gewaschen.

#### 3.3.13.2 Immobilisierung von HaloTag Fusionsproteinen auf paramagnetische *microbeads*

Zur Immobilisierung von HaloTag Fusionsproteinen auf paramagnetische *microbeads* wurden Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 verwendet. Zunächst wurden 100 µl HaloTag-Fusionsprotein enthaltende Proteinlösung mit 2 µl 50 µM HaloTag-Biotin-Ligand 15 min inkubiert. In der Zwischenzeit wurden 10 µl paramagnetische *microbeads* drei Mal mit je 50 µl sGFP-Puffer gewaschen, in 50 µl sGFP-Puffer resuspendiert, und 30 min mit der HaloTag-Fusionsprotein enthaltenden Proteinlösung inkubiert. Anschließend wurden die paramagnetische *microbeads* fünf Mal mit je 100 µl sGFP-Puffer gewaschen.

### 3.4 Zellfreies Proteinexpressionssystem

#### 3.4.1 Herstellung von *E. coli* S30 Extrakt

Die Herstellung des *E. coli* S30 Extrakts (Schwarz *et al.*, 2007, Schneider *et al.*, 2010, Kai *et al.*, 2012) erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Frank Bernhard am Institut für Biophysikalische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt im Rahmen des *IBPB Cell-Free Expression Workshops*.

Hierzu wurden 10 l YTPG-Medium mit 100 ml einer frischen Übernachtskultur des *E. coli* Stamms A19 beimpft. Die Zellen wurden in einem Fermenter (B. Braun Biothec, Melsungen) bei 37 °C und intensiver Belüftung unter Rühren (500 U/min) kultiviert. Das Zellwachstum wurde währenddessen regelmäßig durch Messen der OD<sub>600</sub> überprüft und die Zellsuspension bei Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase (OD<sub>600</sub> von 3,5) auf 14 °C gekühlt. Nach dem Abkühlen wurde die endgültige Zelldichte bestimmt (OD<sub>600</sub> von 4,3) und die Zellen durch Zentrifugation (7 000 × g, 4 °C, 15 min) geerntet. Das Zellsediment wurde in 300 ml S30-A Puffer (4 °C) resuspendiert und sedimentiert (7.00 x g, 4 °C, 10 min). Dieser

---

Waschschrift wurde zweimal wiederholt, wobei die Sedimentationszeit im letzten Waschschrift auf 30 min verlängert wurde. Das Zellsediment wurde gewogen und in der 1,1-fachen Menge (v/w) S30-B Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mittels French<sup>®</sup> Press aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde zentrifugiert ( $30\,000 \times g$ , 4 °C, 30 min), der Überstand in ein frisches Gefäß überführt und erneut zentrifugiert ( $30\,000 \times g$ , 4 °C, 30 min). Das hierbei entstandene S30 Lysat wurde mit einer 5 M NaCl Lösung schrittweise auf eine NaCl-Konzentration von 400 mM eingestellt, und 45 min bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurde das S30-Lysat zweimal (4 und 14 h) gegen 5 l S30-C Puffer dialysiert (14 kDa MWCO), zentrifugiert ( $30\,000 \times g$ , 4 °C, 30 min) und der fertige *E. coli* S30 Extrakt aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der *E. coli* S30-Extrakt wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 3.4.2 Herstellung von T7 RNA-Polymerase

Eine der wichtigsten Komponenten des zellfreien Proteinexpressionssystems ist die T7 RNA-Polymerase, welche in hohen Konzentrationen eingesetzt wird. Diese kann durch Überexpression in *E. coli* mit anschließender Reinigung über Anionenaustauschchromatographie hergestellt werden (Schwarz *et al.*, 2007, Kai *et al.*, 2012).

Hierzu wurden 4 l LB-Medium 40 ml einer frischen Übernachtskultur des *E. coli* Stamms BL21 Star × pAR1219 beimpft. Die Zellen wurden bei 37 °C kultiviert. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 wurde die Expression der T7 RNA-Polymerase mit 1 mM IPTG Endkonzentration induziert und die Zellen weitere 5 h bei 37 °C kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet ( $4\,500 \times g$ , 4 °C, 15 min) und das Zellsediment wurde in 120 ml T7-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen mittels French<sup>®</sup> Press aufgeschlossen, und die Zelltrümmer durch Zentrifugation ( $20\,000 \times g$ , 4 °C, 30 min) entfernt. Der Überstand wurde mit 10 %-iger Streptomycinsulfat Lösung unter Rühren tröpfchenweise auf 2 % Streptomycinsulfat Endkonzentration eingestellt. Die präzipitierte DNA des hierbei trüb gewordenen Zellextraktes wurde durch Zentrifugation ( $30\,000 \times g$ , 4 °C, 30 min) sedimentiert. Die im Zellextrakt enthaltenen T7 RNA-Polymerase wurde über Anionenaustauschchromatographie gereinigt. T7 RNA-Polymerase enthaltende Fraktionen wurden vereinigt, und gegen T7-Dialysepuffer

dialysiert. Die T7 RNA-Polymerase wurde in T7-Dialysepuffer mit 50% Glycerol bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die in diesen Arbeiten verwendete T7 RNA-Polymerase wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Dr. Frank Bernhard am Institut für Biophysikalische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt zur Verfügung gestellt.

### 3.4.3 Zellfreie Proteinexpression

Die zellfreie Proteinexpression erfolgte im *batch*-System (Kai *et al.*, 2012, Kai *et al.*, 2013). Zur besseren Handhabung wurde ein 10 × Premix hergestellt (15 mM Putrescin, 15 mM Spermidin, 2,5 M K<sup>+</sup>-Glutamat, 100 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Glutamat, 100 mM Mg<sup>2+</sup>-Glutamat, 40 mM Na<sup>+</sup>-Oxalat, 330 mM Na<sup>+</sup>-Pyruvat, 340 µg/ml Folsäure, 10 mM DTT, 5,3 mM NAD<sup>+</sup>). Der 10 × Premix sowie alle Stock-Lösungen (mit Ausnahme des *E. coli* S30-Extrakts) wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Tabelle 3.6 Zusammensetzung der zellfreien Proteinexpression im *batch* System

	Stock-Lösung	Endkonzentration	Volumen pro 1 ml
Premix	10	1	100 µl
Aminosäuremix	je 8 mM	je 2 mM	250 µl
PEP	1 mM	33 mM	30 µl
Coenzym A-Na <sup>+</sup>	30 mM	0,27 mM	9 µl
<i>E.coli</i> tRNA	40 mg/ml	0,28 mg/ml	7 µl
T7 RNA Polymerase	1,4 mg/ml	14 µg/ml	10 µl
75 x NTP-Mix	360 mM ATP	5 mM ATP	14 µl
	240 mM G/C/UTP	3,4 mM G/C/UTP	
DTT	10 mM	2 mM	100 µl
Mg <sup>2+</sup> Glu	500 mM	20 mM	20 µl
<i>E. coli</i> S30 Extrakt	100%	33%	300 µl
Matrizen DNA	0,5 ng/µl – 0,5 µg/µl	0,5 ng/ml – 80 µg/ml	1 µl – 160 µl
Wasser	x	x	auf 1 ml auffüllen

Für die zellfreie Proteinproduktion wurden alle Komponenten auf Eis aufgetaut und im entsprechenden Verhältnis zusammen pipettiert. Die zellfreie Proteinproduktion erfolgte bei 37 °C für 1 h.

### 3.4.4 Zellfreie Proteinexpression in Wasser-in-Öl Emulsion

Für die zellfreie Proteinexpression in Wasser-in-Öl Emulsion wurde ein zellfreier Proteinexpressionsansatz wie oben beschrieben hergestellt. In der Regel wurde 1 ml Proteinexpressionsansatz zu 3 ml Emulsionsöl gegeben und im *Ultra-Turrax® Tube Drive*



---

*controle* (IKA, Staufen) 5 min bei 4 000 U/min homogenisiert. Die hierbei entstandene Wasser-in-Öl Emulsion wurde auf 4 1,5 ml Gefäße aufgeteilt, und zur zellfreien Proteinexpression 2 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Wasser-in-Öl Emulsion zur Phasentrennung zentrifugiert (14 000 U/min, 5 min), die Ölphase weitestgehend entfernt, die Lösung mit 600 µl Diethylether versetzt und kräftig gemischt. Die hierbei entstandene Suspension wurde zur Phasentrennung zentrifugiert (14 000 U/min, 5 min), die Lösungsmittelphase wurde entfernt und der Vorgang einmal wiederholt. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und 30 min bei 37 °C ausgedampft bis kein Ethergeruch mehr wahrnehmbar war.

### 3.4.5 Selektion von DNA-Protein-Komplexen

Mit Antikörpern gekoppelte *microbeads* (3.3.11) wurden zur Selektion von DNA-Protein-Komplexen auf Bindungseigenschaften eingesetzt. Hierzu wurden 20 µl des zellfreien Proteinexpressionsansatzes mit 10 µl der mit Antikörpern gekoppelten *microbeads* (3.3.11) 2 Stunden bei RT inkubiert, fünfmal mit je 1 ml PBS gewaschen, in 10 µl Wasser aufgenommen, und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert. Bei der Selektion von DNA-Protein-Komplexen auf Bindungseigenschaften nach zellfreier Proteinexpression in Wasser-in-Öl-Emulsion wurden 20 µl der mit Antikörpern gekoppelten *microbeads* (3.3.11) mit dem gesamten zellfreien Proteinexpressionsansatz 2 Stunden bei RT und 800 rpm inkubiert. Die *microbeads* wurden zur Sedimentation 1 min zentrifugiert, fünfmal mit je 1 ml PBS und fünfmal mit je 200 µl detergentenfreiem HF-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die *microbeads* in 25 µl detergentenfreiem HF-Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert.

### 3.4.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay auf *microbeads* (Bead-ELISA)

Zum Nachweis der Bindung von HaloTag-MP Fusionsproteinen an anti-myc- bzw. anti-Sendai-Antikörper wurden *Bead-ELISA* durchgeführt. Um das HaloTag Fusionsprotein auf den *microbeads* zu immobilisieren, wurden zunächst 50 µl Dynabeads® M-280 Streptavidin zwei Mal mit je 200 µl Binding-Puffer gewaschen und mit 500 µl 2 µM HaloTag-Biotin-Ligand in sGFP-Puffer 1 h inkubiert. Die *microbeads* wurden drei Mal mit je 500 µl sGFP-Puffer gewaschen und in 200 µl sGFP-Puffer aufgenommen. Zur Immobilisation der HaloTag-MP-Fusionsproteine wurden 20 µl des zellfreien Expressionsansatzes mit je 10 µl der mit HaloTag-

---

Biotin-Ligand dekorierten *microbeads* eine Stunde inkubiert. Die *microbeads* wurden drei Mal mit je 200  $\mu$ l sGFP-Puffer gewaschen, in 200  $\mu$ l sGFP-Puffer aufgenommen und mit 10  $\mu$ l anti-myc-Antikörper oder 20  $\mu$ l anti-Sendai-Antikörper 30 min inkubiert. Die *microbeads* wurden drei Mal mit je 20  $\mu$ l sGFP-Puffer gewaschen und mit 200  $\mu$ l einer 1:2000 Verdünnung von alkalischer Phosphatase konjugierten anti-Maus Antikörper in sGFP-Puffer 30 min inkubiert. Die *microbeads* wurden erneut drei Mal mit je 200  $\mu$ l sGFP-Puffer gewaschen, in 20  $\mu$ l sGFP-Puffer aufgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Zur Detektion der Bindung von HaloTag-MP-Fusionsproteinen an anti-myc- bzw. anti-Sendai-Antikörper wurden die *microbeads* mit je 100  $\mu$ l 3 mg/ml PNPP in sGFP-Puffer 15 min bei 30 °C inkubiert. Je 100  $\mu$ l des Überstandes wurden entnommen und die Signalstärke im ELISA-Reader bei  $\lambda = 405$  nm gemessen.

---

## 4 Ergebnisse und Diskussion

---

In dieser Arbeit sollte ein Verfahren zur zellfreien Genotyp-Phänotyp-Kopplung etabliert werden. Dieses beruht auf der kovalenten Verknüpfung der kodierenden DNA Sequenz mit einer, durch *in vitro* Translation synthetisierten Proteinvariante. Die Etablierung eines *in vitro* Translations-verfahrens ist in Kapitel 4.1 beschrieben. Kapitel 4.2 und 4.3 befassen sich mit der Genotyp-Phänotyp-Kopplung. In Kapitel 4.4 ist die Anwendung des in Kapitel 4.3 beschriebenen Verfahrens gezeigt.

### 4.1 Etablierung eines zellfreien Systems zur Expression von HaloTag Fusionsproteinen

Allen *in vitro* Systemen zur Genotyp-Phänotyp-Kopplung ist gemein, dass der Phänotyp durch zellfreie Proteinexpression des Genotyps synthetisiert wird, was die Verwendung eines zellfreien Protein Expressionssystems erforderlich macht. Es existieren unterschiedliche Verfahren zur zellfreien Proteinsynthese, die auf pro- oder eukaryotischen Zellextrakten beruhen und sich in ihrem Aufbau (*batch* oder CECF) unterscheiden (siehe Abschnitt 1.3). Für die Entwicklung eines Systems zur *in vitro* Genotyp-Phänotyp-Kopplung mit IVC ist ausschließlich ein *batch*-System geeignet. Hierbei können sowohl pro- als auch eukaryotische Systeme verwendet werden, wobei die Herstellung prokaryotischer Zellextrakte im Vergleich sehr viel einfacher und kostengünstiger ist. Prokaryotische Systeme zur zellfreien Proteinexpression basieren in der Regel auf *E. coli* S30-Extrakt und werden von verschiedenen Herstellern kommerziell angeboten. Nachteile dieser kommerziell erhältlichen Systeme sind unter anderem sehr hohe Kosten, geringe Reaktionsvolumen, undefinierte Zusammensetzung sowie niedrige Konzentrationen der essentiellen Bestandteile. Die Expremierbarkeit eines Proteins ist stark von der Konzentration an  $Mg^{2+}$ -Ionen abhängig und individuell verschieden und sollte für jedes Zielprotein optimiert werden (Schwarz *et al.*, 2006, Rath *et al.*, 2011). Dies ist in kommerziell erhältlichen Systemen in der Regel nicht möglich. Diese Systeme sind meist auf die Expression des mitgelieferten Kontrollproteins optimiert, was häufig nicht den optimalen Expressionsbedingungen des Zielproteins entspricht und zu niedrigen Proteinausbeuten führen kann.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Frank Bernhard vom Institut für Biophysikalische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt wurde das dort

entwickelte *batch*-System zur zellfreien Proteinsynthese (Kai *et al.*, 2012, Kai *et al.*, 2013) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Harald Kolmar etabliert. Dies wurde gemeinsam mit Frau Stefanie Hörber im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt.

#### 4.1.1 Zellfreie Proteinexpression von sGFP

Zur Quantifizierung der Proteinausbeute des zellfreien Expressionssystems wurde das *red shifted green fluorescent protein* (sGFP) als Reporterprotein verwendet. Dieses wurde zunächst in *E.coli* BL21(DE3) produziert, gereinigt, quantifiziert und eine Referenzgerade der Fluoreszenz in Abhängigkeit der Proteinkonzentration erstellt. Diese Referenzgerade erlaubt später einen Rückschluss auf die Proteinkonzentration des durch zellfreie Proteinexpression hergestellten Reporterproteins sGFP (Kai *et al.*, 2012).

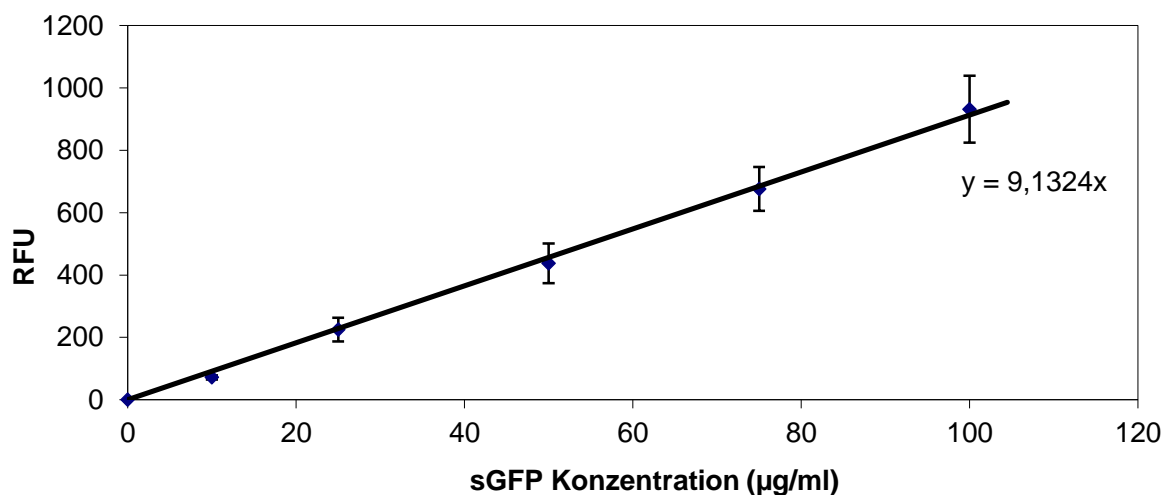


Abbildung 4.1: Referenzgerade der sGFP-Fluoreszenz in Abhängigkeit der Konzentration nach Hörber, 2012. Die Referenzgerade der Fluoreszenz in Abhängigkeit der Proteinkonzentration wurde zur Quantifizierung der durch *in vitro* Proteinexpression hergestellten sGFP beinhaltenen Proteine herangezogen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der gemessenen Fluoreszenz (in RFU) von je 16 Messungen der Konzentrationen 10, 25, 50, 75 und 100 µg/mg sGFP. Die Fehlerbalken entsprechen den dazugehörigen Standardabweichungen.

Hierfür wurden *E.coli* BL21(DE3) Zellen zunächst mit dem Expressionsvektor pET22b-sGFP transformiert (3.1.5). Nach der Kultivierung der transformierten Zelle zur Produktion von sGFP (3.3.1) wurden die Zellen geerntet und mittels *French-Press* aufgeschlossen (3.3.2.2). Anschließend wurde das im Zellaufschluss enthaltene sGFP mittels IMAC gereinigt (3.3.9.1) und dialysiert (3.3.10). Das sGFP wurde über SDS-PAGE analysiert (3.3.6) und anschließend konzentriert (3.3.3). Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des *BCA-Assays* ermittelt (3.3.4) und eine Konzentrationsreihe von 10 bis 100 µg/ml erstellt. Die Fluoreszenz der

unterschiedlichen Proteinkonzentrationen wurde bestimmt (3.3.5). Die hierbei entstandene Referenzgerade der gemessenen Fluoreszenz in Abhängigkeit der sGFP-Konzentration (Abbildung 4.1) wurde zur Quantifizierung nachfolgender zellfreier Proteinexpressionen von sGFP oder sGFP-Fusionsproteinen herangezogen (Hörber, 2012).

Zur Optimierung der zellfreien sGFP Expression wurden die einzelnen Komponenten des zellfreien Expressionssystems, wie für das *batch*-System beschrieben, angesetzt (Kai *et al.*, 2012, Kai *et al.*, 2013). Als Matritzen-DNA wurde der pET22b-sGFP Expressionsvektor mit einer Endkonzentration von 15 µg/ml eingesetzt. In einem Expressionstest mit unterschiedlichen Konzentrationen an Mg<sup>2+</sup> und DTT stellte sich eine Zugabe von 10 mM Mg<sup>2+</sup> und 1 mM DTT als optimal heraus (Hörber, 2012). Die Proteinausbeute lag hier bei ca. 100 µg/ml Reaktionsvolumen.

#### 4.1.2 Zellfreie Proteinexpression in Wasser-in-Öl-Emulsion

In einem System zur *in vitro* Genotyp-Phänotyp-Kopplung, bei dem das kodierende DNA Molekül mit dem Proteinprodukt verknüpft wird, ist eine räumliche Abtrennung der einzelnen DNA Moleküle erforderlich. Anderenfalls kann, durch die Diffusion der mRNA und der Proteinprodukte, eine Kopplung des Proteinprodukts mit dem kodierende DNA Molekül nicht gewährleistet werden. Ansonsten würde ein Gemisch aus Proteinprodukten entstehen, welche zufallsmäßig räumlich naheliegende DNA Moleküle binden würden. Um eine solche räumliche Abtrennung zu erzielen wird dem zellfreien Proteinexpressionsansatz eine Ölphase zugesetzt, und durch kräftiges Mischen eine Wasser-in-Öl-Emulsion generiert. Hierbei wird die Menge der eingesetzten DNA so gewählt, dass statistisch nur ein DNA-Molekül pro Wassertröpfchen vorliegt.

Da die Reaktionsbedingungen der zellfreien Proteinexpression durch diese Kompartimentierung nicht exakt übereinstimmen, zum Beispiel durch den Ausschluss von Luftsauerstoff und durch eventuelle Interaktionen des Proteinexpressionsansatzes mit der Ölphase, wurde die zellfreie Proteinexpression in Wasser-in-Öl-Emulsion zunächst auf ihre Durchführbarkeit und Expressionsausbeute hin getestet. Hierzu wurden mit 150 µl zellfreiem Proteinexpressionsansatz und 1 ml Ölphase eine Wasser-in-Öl-Emulsion hergestellt (3.4.4). Als Matritzen-DNA wurde der pET22b-sGFP Expressionsvektor mit einer Endkonzentration von 15 µg/ml eingesetzt. Die zellfreie Proteinexpression wurde wie beschrieben durchgeführt, die

Emulsion aufgebrochen und die Ausbeute an sGFP durch Messen der Fluoreszenz (3.3.5) ermittelt. Die Proteinausbeute lag hier bei ca. 100 µg/ml Reaktionsvolumen, was der Proteinausbeute der zellfreien Proteinexpression ohne Wasser-in-Öl-Emulsion entspricht. Die Kompartimentierung scheint daher keinen Einfluss auf die zellfreie Proteinexpression zu nehmen.

#### 4.1.3 Expression und Nachweis von funktionellem sGFP-HaloTag-Fusionsprotein im zellfreien System

Die Entwicklung eines *in vitro* Systems zur Genotyp-Phänotyp-Kopplung unter Verwendung der HaloTag-Technologie macht eine zellfreie Proteinexpression von funktionellem HaloTag-Protein erforderlich. Um dies nachzuweisen wurden zunächst auf genetischer Ebene die kodierenden Sequenzen des sGFP-Reporterproteins und des HaloTag-Proteins fusioniert.

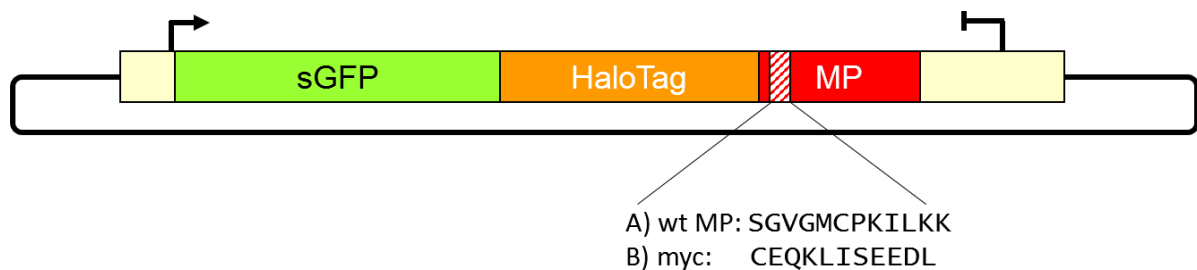


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des pET22b-sGFP-HaloTag-MP/myc Expressionsvektors.

Pfeil: T7-Promotorsequenz; grün: Sequenz des sGFP; orange: Sequenz des HaloTag-Proteins; rot: Sequenz des Miniproteins kodierend für A) wildtyp Sequenz (MP-Variante) oder B) c-myc Epitop (myc-Variante); Balken: T7-Terminatorsequenz.

Für einen späteren Nachweis der Genotyp-Phänotyp-Kopplung wurden zwei unterschiedliche Varianten erstellt, die zusätzlich die ca. 30 Aminosäuren lange Sequenz eines Miniproteins (MP) beinhalten. Die eine Variante enthält die 10 Aminosäuren lange Sequenz des c-myc Epitops EQKLISEEDL und wird im Folgenden als myc-Variante, die zweite (mit dem wt MP Protein) als MP-Variante bezeichnet (Abbildung 4.2). Diese beiden Expressionsvektoren pET22b-sGFP-HaloTag-MP und pET22b-sGFP-HaloTag-myc sowie der pET22b-sGFP wurden wie beschrieben als Matrizen in einer zellfreien Proteinexpression eingesetzt (3.4.3). Die Proteinausbeute wurde durch Messung der sGFP-Fluoreszenz (3.3.5) auf ca. 20 µg/ml bestimmt. Anschließend wurde der zellfreie Proteinexpressionsansatz zur Immobilisierung der sGFP-HaloTag-Fusionsproteine auf *HaloLink<sup>TM</sup> Magnetic Beads* (3.3.13.1) verwendet. Die *HaloLink<sup>TM</sup> Magnetic Beads* wurden im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Hierbei konnten intensiv leuchtende sphärische Partikel bei den mit sGFP-HaloTag-Fusionsproteinlösung

---

behandelten *HaloLink<sup>TM</sup> Magnetic Beads* beobachtet werden. Die mit der sGFP Proteinlösung behandelten *HaloLink<sup>TM</sup> Magnetic Beads* wiesen dagegen keine Fluoreszenz auf. Aufgrund dieser Beobachtungen ist davon auszugehen, dass die sGFP-HaloTag-Fusionsproteine erfolgreich im zellfreien System exprimiert werden konnten. Das vollständige und funktionelle HaloTag-Protein konnte kovalent auf der Oberfläche der *HaloLink<sup>TM</sup> Magnetic Beads* immobilisiert und im Fluoreszenzmikroskop optisch nachgewiesen werden.

#### 4.1.4 Diskussion

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit sollte ein System zur zellfreien Proteinexpression in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Harald Kolmar etabliert werden. Hierzu wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Frank Bernhard vom Institut für Biophysikalische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt das dort entwickelte *batch* System zur zellfreien Proteinsynthese (Kai et al., 2012, Kai et al., 2013) nachgestellt. In ersten Versuchen konnte eine Proteinexpressionsausbeute des Reporterproteins sGFP von ca. 100 µg/ml erzielt werden. Dies stellt eine mäßig-gute Proteinexpressionsausbeute dar, da mit dem *batch* System Proteinexpressionsausbeuten zwischen 400 und 600 µg/ml erzielt werden können (Kai et al., 2012). Expressionstests zur zellfreien Proteinexpression von sGFP in Wasser-in-Öl-Emulsionen zeigten eine vergleichbare Expressionsrate. Die Kompartimentierung der zellfreien Proteinexpression scheint daher keinen Einfluss auf die Expriemierbarkeit von Proteinen auszuüben.

Weiter wurde die Exprimierbarkeit von funktionellem sGFP-HaloTag Fusionsproteinen getestet. Hierbei konnte eine Expressionsausbeute von ca. 20 µg/ml erzielt werden. Eine niedrigere Expressionsrate im Vergleich zum sGFP ist hierbei zu erwarten, da die gleiche Menge an Matrizen DNA zur zellfreien Proteinexpression eingesetzt wurde, was aufgrund der Größe der DNA Moleküle in einer geringeren Anzahl an eingesetzten DNA Molekülen resultiert. Gleichzeitig ist der Energiebedarf zur Expression größerer Proteine gesteigert, was sich in einer niedrigeren Proteinausbeute widerspiegelt. Weiter konnte die Funktionalität des sGFP-HaloTag Fusionsproteins durch Immobilisierung auf der Oberfläche der *HaloLink<sup>TM</sup> Magnetic Beads* und anschließender Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden.

---

Das System zur zellfreien Proteinexpression im *batch* Verfahren konnte somit erfolgreich in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Harald Kolmar etabliert werden und steht zur Verwendung in Systemen zur *in vitro* Genotyp-Phänotyp-Kopplung in IVC bereit.

## 4.2 HaloTag *microbead display*

Eine Möglichkeit der multivalenten *in vitro* Genotyp-Phänotyp-Kopplung stellt das *microbead display* dar. Hierbei wird der Genotyp, in Form von DNA, über Microbeads mit den hierin kodierten Proteinprodukten verknüpft (Sepp *et al.*, 2002, Gan *et al.*, 2008, Diamante *et al.*, 2013). Im Folgenden wurde versucht ein *microbead display* unter Verwendung der HaloTag-Technologie zu entwickeln.

Bei diesem System werden zunächst Biotin gekoppelte Primer sowie der HaloTag-Biotin-Ligand auf Steptavidin *microbeads* immobilisiert. Im Anschluss wird die Matrizen-DNA, die für ein HaloTag-Fusionsprotein kodiert, in einer emPCR auf den *microbeads* amplifiziert. Die Menge der eingesetzten Matrizen-DNA wurde hierbei so gewählt, dass sich statistisch nur ein DNA-Molekül in einem Kompartiment befindet. Nach erfolgreicher emPCR sollten die *microbeads* mit multiplen Kopien einer einzelnen DNA-Variante dekoriert sein. Im Anschluss wurde die Emulsion aufgebrochen und die *microbeads* in einer zellfreien Proteinexpression in Wasser-in-Öl-Emulsion eingesetzt. Die hierbei synthetisierten HaloTag-Fusionsproteine sollten nun den immobilisierten HaloTag-Biotin-Liganden kovalent binden. Somit sind sowohl die Matrizen-DNA, sowie die hierin kodierten Proteinprodukte in vielfacher Kopienzahl auf den *microbeads* immobilisiert, was einer multivalenten Genotyp-Phänotyp-Kopplung entspricht. Dieses HaloTag *microbead display* ist in Abbildung 4.3 schematisch dargestellt.

Zur Realisierung eines solchen Systems müssen einige kritische Schritte getestet werden. So ist zunächst die Etablierung einer emPCR erforderlich. Hierbei muss sichergestellt sein, dass statistisch jeweils ein DNA-Molekül in einem Wasser-in-Öl Kompartiment amplifiziert und auf einem *microbead* Partikel immobilisiert wird. Weiter muss eine zellfreie Wasser-in-Öl Proteinexpression der auf den *microbeads* immobilisierten Matrizen DNA gewährleistet sein. Zudem müssen die aus der zellfreien Proteinexpression resultierenden Proteinprodukte nachweisbar neben der Matrizen-DNA auf den *microbead* co-immobilisiert werden. Im Anschluss ist ein geeignetes Selektionsverfahren zu etablieren, um Varianten mit gewünschten Eigenschaften anreichern zu können.



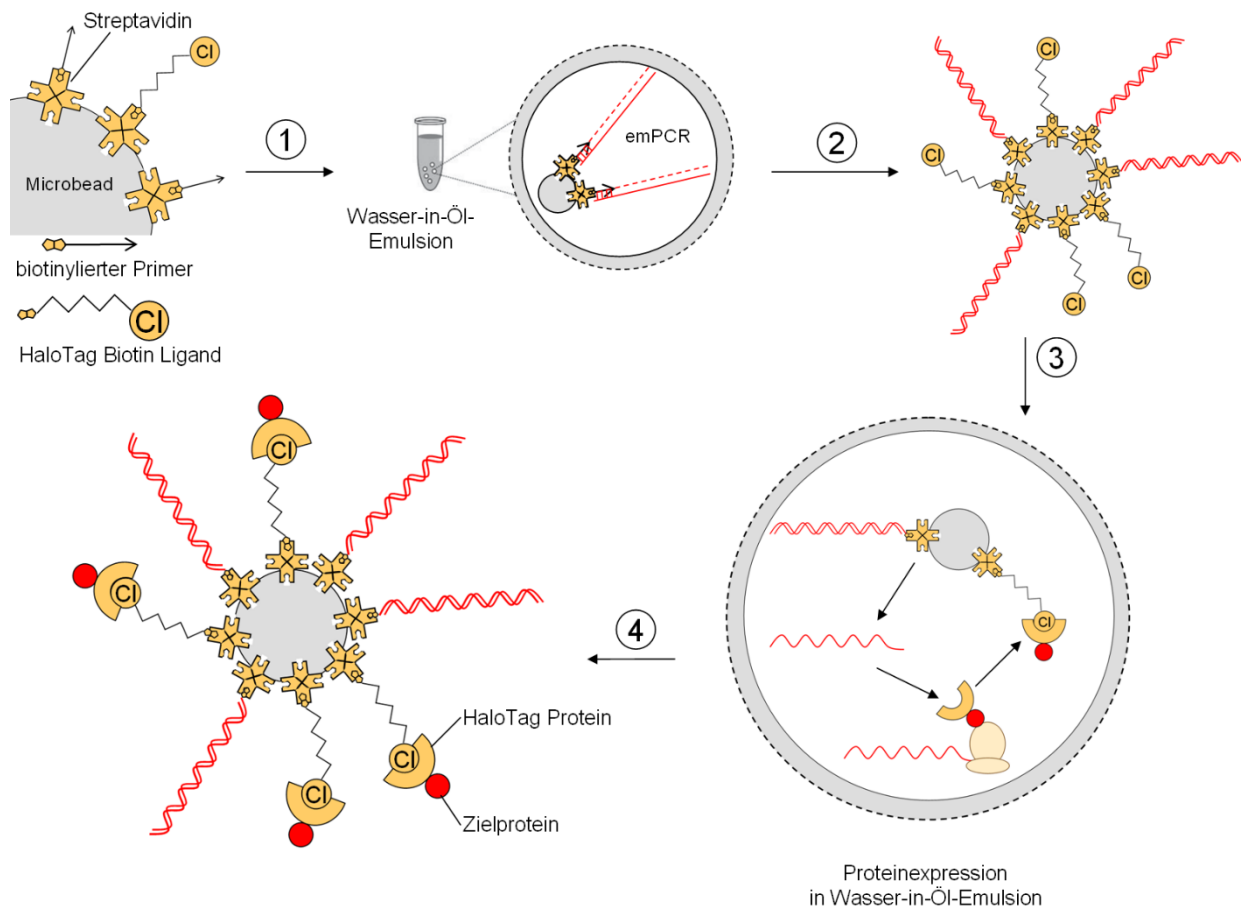


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung des HaloTag *microbead display*

1) Auf Streptavidin *microbeads* werden biotinylierte *reverse*-Primer und der HaloTag-Biotin-Ligand immobilisiert. Diese *microbeads* werden in einer emPCR zur Amplifikation der jeweils einzelnen Bibliotheksmitglieder eingesetzt. 2) Die Emulsion wird aufgebrochen. Einzelne *microbeads* tragen jeweils multiple Kopien eines einzelnen Bibliotheksmitglieds. 3) Die *microbead*-Komplexe werden zur zellfreien Proteinexpression in einer Wasser-in-Öl-Emulsion eingesetzt. Hierbei wird die DNA zunächst in mRNA transkribiert und hiernach das HaloTag-Fusionsprotein translatiert. Dieses kann nun an den immobilisierten HaloTag-Biotin-Liganden binden, wodurch eine Genotyp-Phänotyp-Kopplung entsteht. 4) Die Emulsion wird aufgebrochen. Die *microbeads* tragen nun etliche Kopien der Matrizen-DNA sowie eine Vielzahl des hierin kodierten HaloTag-Fusionsproteins. Diese können zur Selektion auf einen gewünschten Phänotyp eingesetzt werden.

#### 4.2.1 Einzelmolekül PCR auf *microbeads* in Wasser-in-Öl-Emulsion

Im ersten Schritt des HaloTag *microbead display* wird eine emPCR auf den *microbeads* durchgeführt, um die Genotyp-Varianten in multipler Kopienzahl auf den *microbeads* zu immobilisieren. Um dies zu testen, wurden zunächst zwei Matrizen-DNA-Fragmente von ca. 1150 bp Länge generiert, die sich in ihrer Sequenz nur in einem Bereich von 30 bp unterscheiden. Hierfür wurden die Vektoren pET32a-Trx-MC-WT-SecM und pET32a-Trx-MC-myc-SecM (Lang, 2008) als Matrizen-DNA in einer PCR (3.2.7) mit den Primern pET-universal-

up und pET-universal-lo eingesetzt. Die hierbei entstandenen DNA-Fragmente univ-Trx-MP-univ und univ-Trx-myc-univ wurden im Agarosegel analysiert (3.2.3.1) und gereinigt (3.2.4).

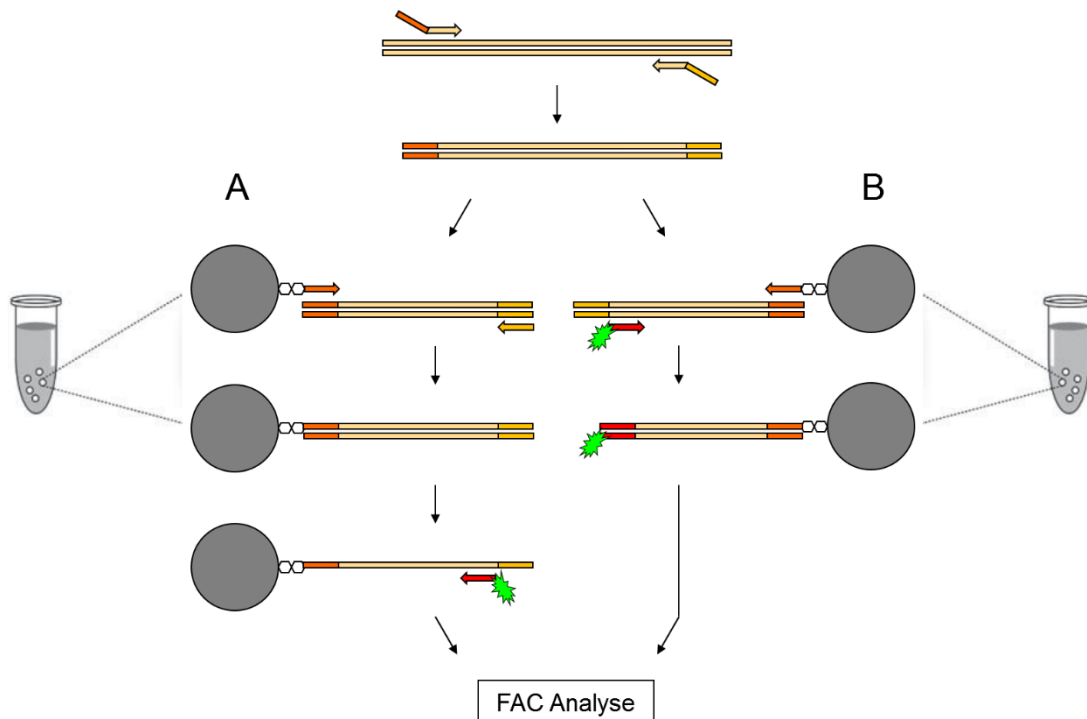


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der emPCR und der optimierten emPCR und deren Nachweis.

Für die emPCR wird zunächst eine geeignete DNA-Matrize generiert. Hierbei werden universale Primer Sequenzen eingefügt. Gleichzeitig werden Biotin markierte universal-up Primer auf der Oberfläche von Streptavidin *microbeads* immobilisiert. DNA-Matrize und *microbeads* werden zur PCR in Wasser-in-Öl-Emulsion eingesetzt. Bei der ursprünglichen emPCR (A) wird der universal-up Primer zur Amplifikation verwendet. Der auf den *microbeads* immobilisierte universal-up Primer wird während der Amplifikation in 5' Richtung verlängert. Hierdurch ist der neu synthetisierte DNA-Strang auf der *microbead*-Oberfläche immobilisiert. Die Emulsion wird aufgebrochen und der nichtbiotinylierte DNA-Strang durch NaOH-Behandlung entfernt. Anschließend findet eine Hybridisierung des DNA-Strangs mit einem fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid statt. Die hierdurch eingebrachte Fluoreszenz kann mittels FAC-Analyse detektiert werden. In Gegensatz hierzu wird bei der optimierten emPCR (B) das fluoreszenzmarkierte Oligonukleotid direkt zur Amplifikation der Matrizen-DNA eingesetzt. Hierdurch können die *microbeads* nach dem Aufbrechen der Emulsion direkt im FAC analysiert werden. Das Entfernen des nichtbiotinylierten DNA-Strangs, sowie der Hybridisierungsschritt entfallen hierbei.

Die gereinigten DNA-Fragmente univ-Trx-MP-univ und univ-Trx-myc-univ wurden in einer emPCR mit 150 µl Reaktionsvolumen eingesetzt. Die emPCR wurden wie in Abschnitt 3.2.7.4 beschrieben durchgeführt. Hierbei wurden die über Streptavidin-Biotin-Bindung auf den *microbeads* immobilisierten Primer in 3-Richtung verlängert. Anschließend wurde die Emulsion aufgebrochen und die nicht biotinylierten DNA-Stränge der PCR-Produkte durch Behandlung mit 0,1 M NaOH-Lösung entfernt. Die immobilisierten DNA-Stränge wurden mit den fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden MP-lo-(Flc) und myc-lo-(Cy5) hybridisiert. Die *microbeads* wurden im FAC analysiert, wobei die hybridisierten fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide eine Verschiebung der relativen Fluoreszenz bewirken sollen. Die einzelnen

Schritte der emPCR, sowie der optimierten emPCR und deren Nachweis sind in Abbildung 4.4 schematisch dargestellt.

Die FAC-Analyse der analysierten *microbeads* nach emPCR und Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden zeigt eine eindeutige Verschiebung der relativen Fluoreszenz im Vergleich mit unbehandelten Kontroll-*microbeads* (Abbildung 4.5). Hierdurch kann auf eine erfolgreiche Amplifikation und Immobilisierung der PCR-Produkte geschlossen werden. Eine PCR in Wasser-in-Öl Emulsion mit gleichzeitiger Immobilisierung der PCR-Produkte auf *microbeads* ist demnach möglich. Unklar ist jedoch weiterhin, ob es sich hierbei um eine Einzelmolekül-PCR handelt, oder ob auf einem *microbead* mehrere verschiedene DNA Matrizen Varianten vertreten sind.

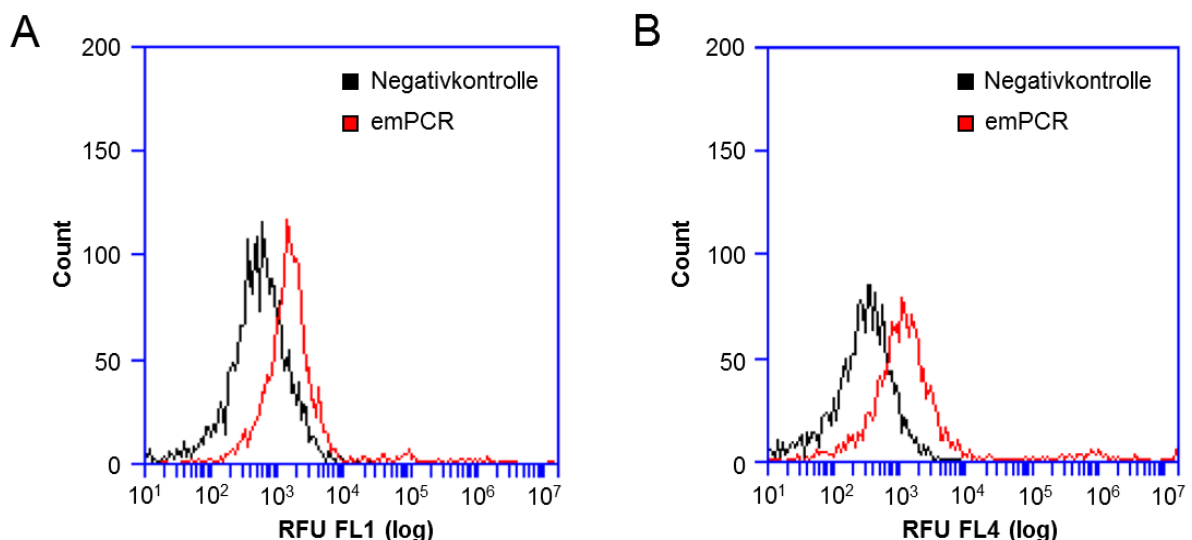


Abbildung 4.5: FAC-Analyse der *microbeads* nach emPCR und Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden.

Überlagerung der FAC-Diagramme der Negativkontrolle (unbehandelte Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1) und der emPCR nach Hybridisierung mit (A) MP-lo-(Flc) zur Visualisierung der univ-Trx-MP-univ PCR Produkte und (B) myc-lo-(Cy5) zur Visualisierung der univ-Trx-myc-univ PCR Produkte. X-Achse: logarithmisch aufgetragene relative Fluoreszenz (A) FL1 des Fluorescein gekoppelten Oligonukleotids MP-lo-(Flc) bzw. (B) FL4 des Cy5 gekoppelten Oligonukleotids myc-lo-(Cy5); Y-Achse: Anzahl der gemessenen Ereignisse.

Um dies zu überprüfen wurde die emPCR erneut getestet. Aufgrund hoher Verluste an *microbeads* während dem Aufbrechen der Wasser-in-Öl-Emulsion, wurde die emPCR zunächst optimiert. Bei der optimierten emPCR wurde das Reaktionsvolumen von 150  $\mu$ l auf 1 ml angehoben. Zudem wurden die fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide direkt als PCR-Primer in die Reaktion eingesetzt. Hierdurch kann auf eine Denaturierung der PCR Produkte mit Natronlauge und das Entfernen des nichtbiotinylierten DNA Strangs sowie auf die Hybridisierung mit den fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden verzichtet werden. Weiter

wurde zum Aufbrechen der Emulsion neben dem Breaking-Puffer auch Isopropanol verwendet, wodurch die Verluste an *microbeads* minimiert werden konnten (3.2.7.4).

Eine optimierte emPCR wurde durchgeführt und die Produkte wurden anschließend mittels FAC analysiert: Neben den *microbeads* der emPCR (Abbildung 4.6 B) wurden auch unbehandelte *microbeads* als Negativkontrolle (Abbildung 4.6 A) sowie *microbeads*, auf denen die Produkte der nicht in Wasser-in-Öl Emulsion durchgeführten Kontroll-PCR immobilisiert wurden (Abbildung 4.6 C), untersucht.

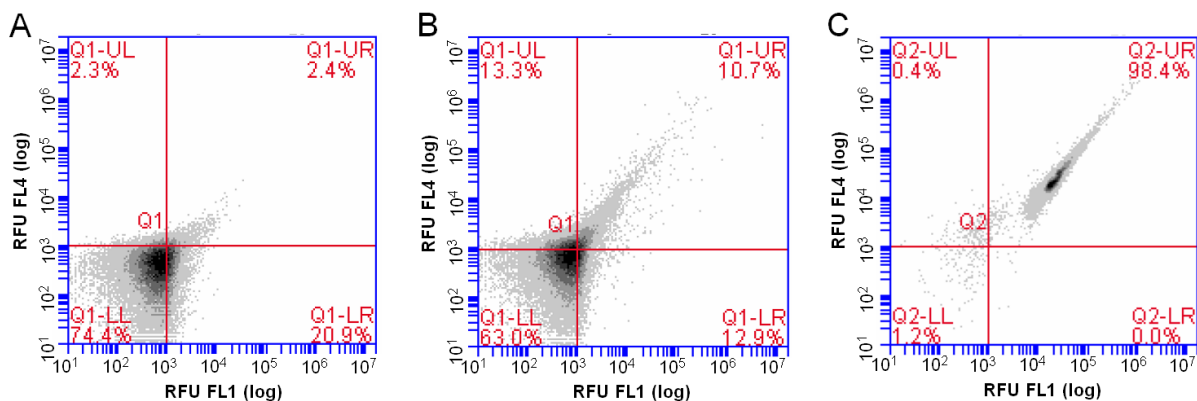


Abbildung 4.6: FAC-Analyse der *microbeads* nach optimierter emPCR.

A) Negativkontrolle unbehandelte Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1. B) *microbeads* nach optimierter emPCR. C) Kontroll-PCR-Produkte auf *microbeads* immobilisiert. X-Achse: logarithmisch aufgetragene relative Fluoreszenz FL1 des Fluorescein gekoppelten Oligonukleotids MP-lo-(Flc); Y-Achse: logarithmisch aufgetragene relative Fluoreszenz FL4 des Cy5 gekoppelten Oligonukleotids myc-lo-(Cy5).

Die Analyse der *microbeads* im FAC zeigt, dass während der emPCR auf einigen *microbeads* erfolgreich eine Amplifikation stattgefunden hat. Im Vergleich zu der FAC-Analyse der unbehandelten *microbeads* der Negativkontrolle (Abbildung 4.6 A), zeigt das Diagramm der *microbeads* nach optimierter-emPCR eine leichte Verschiebung der relativen Fluoreszenzen FL1 und FL4 (Abbildung 4.6 B). Die nachträglich auf den *microbeads* immobilisierten PCR-Produkte der Kontroll-PCR hingegen zeigen eine sehr deutliche Verschiebung der relativen Fluoreszenzen FL1 und FL4 (Abbildung 4.6 C). Es ist zu erwarten, dass beide DNA-Fragmente (univ-Trx-MP-univ und univ-Trx-myc-univ) zu etwa gleichen Teilen in der Kontroll-PCR amplifiziert werden. Dies konnte durch die analoge Zunahme der relativen Fluoreszenzen FL1 und FL4 bestätigt werden (Abbildung 4.6 C). Gleichzeitig würde man bei einer Einzelmolekül-PCR nur eine Variante (univ-Trx- MP-lo-(Flc) oder univ-Trx-myc-lo-(Cy5)) an PCR-Produkt pro *microbead* erwarten, was eine Zunahme der relativen Fluoreszenzen FL1 oder FL4 zur Folge hätte. Die FAC-Analyse der *microbeads* nach optimierter emPCR zeigt hingegen nur eine simultane Verschiebung der beiden relativen Fluoreszenzen FL1 und FL4 (Abbildung 4.6 B),

was auf eine Amplifikation mehrerer Matrizen-DNA-Moleküle pro Kompartiment schließen lässt.

Um zu visualisieren wie sich *microbeads*, die nur eine Variante an PCR-Produkt tragen im FAC-Diagramm darstellen, wurden die univ-Trx-MP-univ und univ-Trx-myc-univ DNA Fragmente als Matrizen-DNA in PCR mit den Primern Dual-Biotin-universal-up sowie MP-lo-(Flc) bzw. myc-lo-(Cy5) eingesetzt. Die entstandenen PCR-Produkte wurden im Agarosegel analysiert (3.2.3.1). Die Biotin markierten PCR-Produkte wurden auf *microbeads* immobilisiert (3.2.8) und anschließend im FAC analysiert (Abbildung 4.7 A und B). Parallel hierzu wurden dieselben DNA-Fragmente als Matrize in einer PCR mit den Primern Dual-Biotin-universal-up und universal-lo eingesetzt. Die hierbei entstandenen PCR-Produkte weisen demnach keine Fluoreszenzmarkierung auf und sollten im FAC keine Verschiebung der relativen Fluoreszenz bewirken. Diese PCR-Produkte wurden ebenfalls im Agarosegel analysiert (3.2.3.1), auf *microbeads* immobilisiert (3.2.8) und im FAC untersucht (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden alle vier *microbead* Varianten zu gleichen Teilen gemischt und im FAC analysiert (Abbildung 4.7 C).

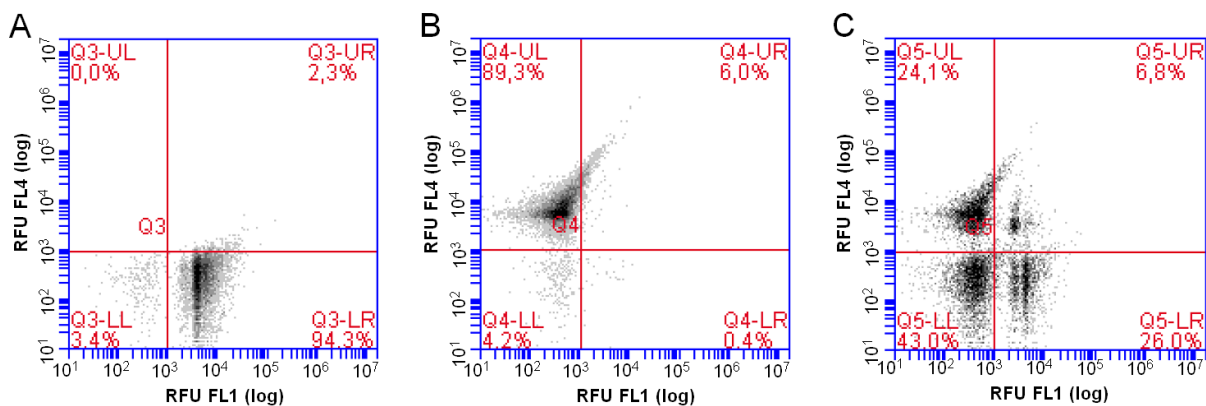


Abbildung 4.7: FAC-Analyse von immobilisierten PCR Produkten auf *microbeads*.

A) Biotin markiertes PCR-Produkt univ-Trx- MP-lo-(Flc) immobilisiert auf *microbeads*. B) Biotin markiertes PCR-Produkt univ-Trx- myc-lo-(Cy5) immobilisiert auf *microbeads*. C) Mischung aus *microbeads* immobilisiert mit den Biotin markierten PCR-Produkten univ-Trx- MP-lo-(Flc), univ-Trx- myc-lo-(Cy5), univ-Trx-MP-univ und univ-Trx-myc-univ. X-Achse: logarithmisch aufgetragene relative Fluoreszenz FL1 des Fluorescein gekoppelten Oligonukleotids MP-lo-(Flc); Y-Achse: logarithmisch aufgetragene relative Fluoreszenz FL4 des Cy5 gekoppelten Oligonukleotids myc-lo-(Cy5).

Zur erfolgreichen Realisierung des HaloTag *microbead displays* ist eine Einzelmolekül-PCR auf *microbeads* in Wasser-in-Öl-Emulsion zwingend erforderlich. Nur wenn gewährleistet ist, dass auf dem Großteil der *microbeads* lediglich eine DNA-Variante in multipler Kopienzahl immobilisiert ist, kann eine Genotyp-Phänotyp-Kopplung erzielt werden. Das in Abbildung 4.6 B dargestellte FAC-Diagramm der *microbeads* nach optimierter emPCR deutet jedoch darauf hin, dass die *microbeads* mit einer Mischung von PCR-Produkten beider DNA-Varianten dekoriert

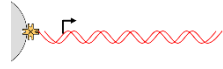
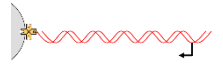
sind. Für eine erfolgreiche Einzelmolekül-PCR würde man ein FAC-Diagramm erwarten, wie es die Mischung aus *microbeads*, auf denen die mit den Biotin markierten PCR-Produkten univ-Trx- MP-lo-(Flc), univ-Trx- myc-lo-(Cy5), univ-Trx-MP-univ und univ-Trx-myc-univ immobilisiert sind, zeigt (Abbildung 4.7 C). Hier sind vier deutlich voneinander getrennte *microbead* Populationen erkennbar: nichtfluoreszierende *microbeads*, *microbeads*, die die relative Fluoreszenz FL1 des Fluorescein gekoppelten Oligonukleotids MP-lo-(Flc) aufweisen; *microbeads*, die die relative Fluoreszenz FL4 des Cy5 gekoppelten Oligonukleotids myc-lo-(Cy5) aufweisen und *microbeads*, die sowohl die relative Fluoreszenz FL1 des Fluorescein gekoppelten Oligonukleotids MP-lo-(Flc) als auch die relative Fluoreszenz FL4 des Cy5 gekoppelten Oligonukleotids myc-lo-(Cy5) aufweisen. Eine Einzelmolekül-PCR auf *microbeads* in Wasser-in-Öl Emulsion konnte demnach in den Vorexperimenten nicht nachgewiesen werden.

#### 4.2.2 Zellfreie Proteinexpression auf *microbeads*

In einem weiteren Schritt des HaloTag *microbead displays* werden die zuvor mittels emPCR generierten *microbeads*, auf denen jeweils eine DNA-Matrizen-Variante in multipler Kopienzahl immobilisiert ist, zur zellfreien Proteinexpression in IVC eingesetzt. Hierbei muss die immobilisierte Matrizen-DNA durch die im Expressionsansatz enthaltene T7 RNA Polymerase zunächst in mRNA transkribiert und das mRNA-Transkript in ein Proteinprodukt translatiert werden. Hierbei sollte zunächst überprüft werden, ob die Orientierung der Matrizen-DNA auf *microbeads* einen Einfluss auf die Expression der hierin kodierten Gene hat. Dazu wurden mittels PCR zwei Matrizen-Varianten des sGFP Gens hergestellt, wobei die eine *upstream* des sGFP-Gens am 5' Ende des kodierenden DNA Strangs (Biotin-sGFP), die andere *downstream* des sGFP-Gens am 5' Ende des nichtkodierenden DNA Strangs (sGFP-Biotin) eine Biotin-Markierung aufweisen. Somit konnten die Matrizen-DNA Stränge in unterschiedlicher Orientierung auf den *microbeads* immobilisiert werden (Schematische Darstellung in Tabelle 4.1). Zum Testen der Expriemierbarkeit wurden je 1,2 µg der Biotin markierten PCR-Produkte auf 20 µl Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 immobilisiert (3.2.8). Diese wurden in Wasser aufgenommen und als DNA-Matrize in einem 100 µl zellfreien Proteinexpressionsansatz eingesetzt (3.4.3). Im Anschluss wurde die Ausbeute an sGFP durch Messen der Fluoreszenz ermittelt (3.3.5). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Hierbei zeigte sich, dass

die Orientierung der DNA-Matrize einen gravierenden Einfluss auf die Produktion des Genprodukts hat. *Microbeads*, auf denen die Matrizen-Variante Biotin-sGFP immobilisiert war, zeigten eine kaum nachweisbare Proteinexpression von ca. 1 µg/ml, wohingegen jene, auf denen die sGFP-Biotin-Variante immobilisiert war, eine gute Proteinexpressionsrate von ca. 33 µg/ml aufwiesen.

Tabelle 4.1: Proteinausbeuten der zellfreien Proteinexpression auf *microbeads* in Abhängigkeit der Orientierung der Matrizen-DNA. Die Orientierung der Matrizen-DNA auf den *microbeads* ist schematisch dargestellt. Die Leserichtung wird durch den Pfeil gekennzeichnet.

DNA Matrize	Leserichtung	Proteinausbeute
Biotin-sGFP		<1 µg/ml
sGFP-Biotin		33 µg/ml

In einem weiteren Schritt wurde die zellfreie Proteinexpression auf *microbeads* in Wasser-in-Öl Emulsion getestet. Hierzu wurde wie oben beschrieben das sGFP-Biotin PCR-Produkt auf *microbeads* immobilisiert. Diese *microbeads* wurden als Matrizen-DNA in einem 100 µl zellfreien Proteinexpressionsansatz eingesetzt (3.4.3). Der Proteinexpressionsansatz wurde mit 1 ml Emulsionsöl homogenisiert, um die Wasser-in-Öl Emulsion zu generieren. Die Proteinexpression wurde durchgeführt und die Emulsion wie beschrieben aufgebrochen (3.4.4). Die Ausbeute an sGFP wurde durch Messen der Fluoreszenz ermittelt (3.3.5) und lag bei 10,8 µg/ml sGFP. Eine zellfreie Proteinexpression auf *microbeads* in Wasser-in-Öl Emulsion konnte somit nachgewiesen werden.

#### 4.2.3 Co-Immobilisierung von Matrizen-DNA und Proteinprodukten

Im Anschluss an die Proteinexpression ist im HaloTag *microbead display* eine Immobilisierung der neusynthetisierten HaloTag Fusionsproteine auf den *microbeads* notwendig. Diese Immobilisierung sollte über die Streptavidin-Biotin Bindung der *microbeads* und des HaloTag® Biotin-Liganden vermittelt werden. Demnach sollte das HaloTag-Fusionsprotein kovalent an den zuvor immobilisierten Liganden binden, um so *microbeads* zu erhalten, die sowohl mit der Matrizen-DNA als auch dem daraus resultierenden Proteinprodukt dekoriert sind. Um diese Co-Immobilisierung von Matrizen-DNA und Proteinprodukt zu testen, wurden zunächst über PCR (3.2.7) die zwei Matrizen-DNA generiert. Diese Fragmente sGFP-HaloTag-MP-Biotin und sGFP-HaloTag-myc-Biotin wurden im Agarosegel analysiert



(3.2.3.1) und gereinigt (3.2.4). Je 1,5 µg Matrizen-DNA wurden mit je 0,1 µg HaloTag®Biotin Ligand auf je 20 µl Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 ( $1,4-2,4 \times 10^8$ ) immobilisiert (3.2.8) und in Wasser aufgenommen. Diese *microbeads* wurden als Matrizen-DNA in einem 100 µl zellfreien Proteinexpressionsansatz eingesetzt (3.4.3). Die hierbei entstandene sGFP-HaloTag-Fusionsproteine wurden durch Messung der sGFP-Fluoreszenz im Überstand quantifiziert (3.3.5). Die zur zellfreien Proteinexpression verwendeten *microbeads* wurden fünfmal mit sGFP-Puffer gewaschen und zur Detektion von immobilisierten sGFP-HaloTag Fusionsproteinen im FAC analysiert (Abbildung 4.8).

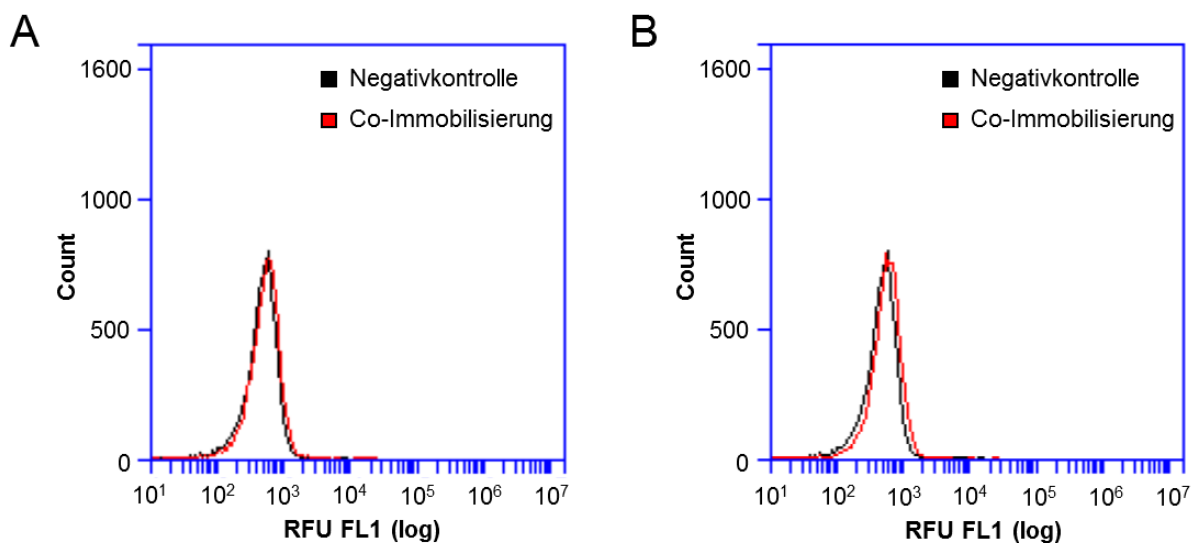


Abbildung 4.8: FAC-Analyse der Co-Immobilisierung von DNA und sGFP-HaloTag-Fusionsprotein nach zellfreier Proteinexpression.

Überlagerung der FAC-Diagramme der Negativkontrolle (unbehandelte Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1) und der Co-Immobilisierung von DNA und sGFP-HaloTag-Fusionsprotein nach zellfreier Proteinexpression (A) Immobilisierung von sGFP-HaloTag-MP-Biotin PCR Produkten und (B) Immobilisierung von sGFP-HaloTag-myc-Biotin PCR Produkten. X-Achse: logarithmisch aufgetragene relative Fluoreszenz FL1 der sGFP-Fusionsproteine; Y-Achse: Anzahl der gemessenen Ereignisse.

Die Messung der sGFP-Fluoreszenz im Überstand zeigte eine gute Proteinexpression von 20 µg/ml. Auf den *microbeads* konnte hingegen kein immobilisiertes sGFP-HaloTag-Fusionsprotein im FAC nachgewiesen werden (Abbildung 4.8). Um zu untersuchen, ob der HaloTag-Teil des Fusionsproteins funktionsfähig ist, sollten die im Überstand nachweislich vorhandenen Fusionsproteine auf *microbeads* immobilisiert und im FAC nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Überstände der zellfreien Proteinexpressionsansätze zunächst 15 min mit je 0,4 µg HaloTag®Biotin-Ligand und anschließend mit je 10 µl Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 ( $0,7-1,2 \times 10^8$ ) in sGFP Puffer 30 min inkubiert. Die *microbeads* wurden fünfmal mit je 100 µl sGFP-Puffer gewaschen und im FAC analysiert (Abbildung 4.9).



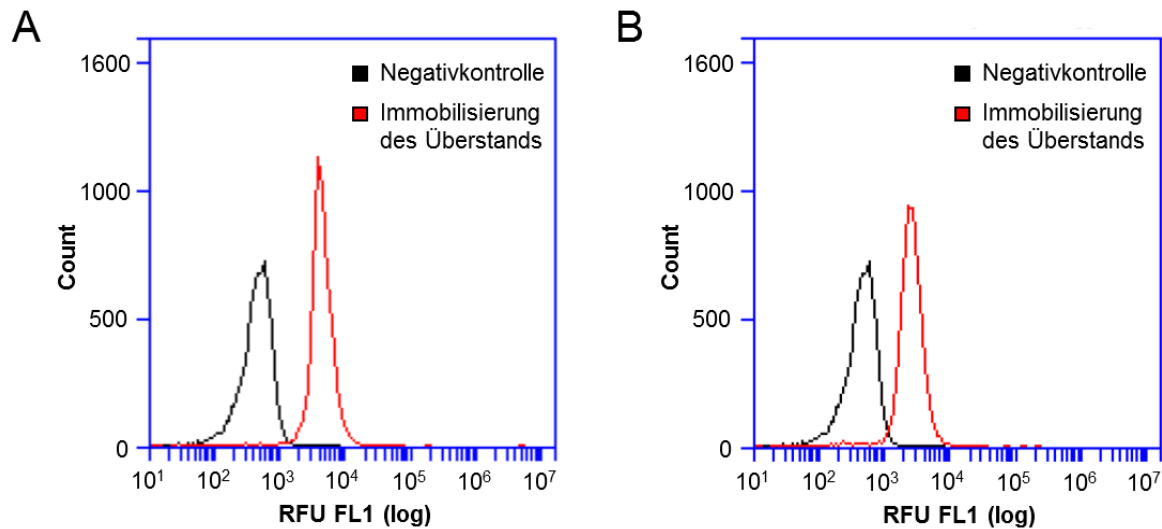


Abbildung 4.9: FAC-Analyse der Immobilisierung von sGFP-HaloTag-Fusionsprotein auf *microbeads* nach zellfreier Proteinexpression über HaloTag-Technologie.

Überlagerung der FAC-Diagramme der Negativkontrolle (unbehandelte Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1) und der *microbeads* nach Immobilisierung von sGFP-HaloTag-Fusionsproteinen nach zellfreier Proteinexpression aus dem Überstand. (A) Immobilisierung von sGFP-HaloTag-MP- Fusionsprotein und (B) Immobilisation von sGFP-HaloTag-myc- Fusionsprotein. X-Achse: logarithmisch aufgetragene relative Fluoreszenz FL1 der sGFP-Fusionsproteine; Y-Achse: Anzahl der gemessenen Ereignisse.

Die sGFP-HaloTag-Fusionsproteine aus den Überständen der zellfreien Proteinexpressionen konnten über den HaloTag® Biotin-Liganden erfolgreich auf der Oberfläche der *microbeads* immobilisiert werden. Dies konnte durch die Verschiebung der relativen Fluoreszenz dieser *microbeads* im Vergleich zu unbehandelten *microbeads* nachgewiesen werden (Abbildung 4.9). Vermutlich wurde die Bindung während der zellfreien Proteinexpressionen durch die bereits immobilisierten PCR-Produkte sterisch behindert. Um den sGFP-HaloTag-Fusionsproteinen mehr Raum zur Bindung an die *microbeads* zu geben, wurde die Co-Immobilisierung von Matrizen-DNA und Proteinprodukten wiederholt. Die eingesetzte Menge der Matrizen-DNA-Fragmente wurde hierbei von 1,2 µg auf 0,2 µg unter Beibehaltung aller weiteren Parameter reduziert. Die zellfreie Proteinexpression der sGFP-HaloTag-Fusionsproteine wurde wie beschrieben wiederholt. Eine FAC-Analyse der eingesetzten *microbeads* zeigte jedoch keine Verschiebung der relativen Fluoreszenz FL1 gegenüber der Kontrolle (Daten nicht gezeigt). Die Proteinausbeute im Überstand wurde durch Messung der sGFP-Fluoreszenz (3.3.5) auf <1,5 µg/ml bestimmt. Die sich im Überstand befindlichen sGFP-HaloTag-Fusionsproteine wurden wie beschrieben auf *microbeads* immobilisiert und diese im FAC analysiert. Auch hier konnte keine Verschiebung der relativen Fluoreszenz FL1 gegenüber der Kontrolle, und damit die Bindung der Fusionsproteine an die *microbeads* nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). In einem weiteren Versuch wurde die Menge der eingesetzten Matrizen-DNA-

Fragmente auf 60 ng reduziert. Eine Co-Immobilisierung von Matrizen-DNA und Proteinprodukten auf *microbeads* konnte jedoch auch hierbei nicht gezeigt werden und scheint daher aus sterischen Gründen nicht möglich.

#### 4.2.4 Diskussion

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde versucht ein HaloTag *microbead display* System zur multivalenten *in vitro* Genotyp-Phänotyp-Kopplung zu entwickeln. Dieses ist an die in Abschnitt 1.2.2 beschriebenen *microbead display* Systeme angelehnt (Sepp *et al.*, 2002, Gan *et al.*, 2008, Diamante *et al.*, 2013). Abbildung 4.3 zeigt die schematische Darstellung des HaloTag *microbead display* Systems, bei dem sowohl die Matrizen DNA, als auch das daraus resultierende Proteinprodukt auf der Oberfläche von *microbeads* co-immobilisiert werden. Hierzu werden einzelne DNA Matrizen Moleküle mittels emPCR auf den *microbeads* amplifiziert und diese zur zellfreien Proteinexpression in IVC eingesetzt. Die neu synthetisierten HaloTag Fusionsproteine sollten dann den zuvor auf den *microbeads* immobilisierten HaloTag Liganden kovalent binden. Die hierbei mit Genotyp und Phänotyp dekorierten *microbeads* sollten anschließend zur Selektion gewünschter Eigenschaften eingesetzt werden können.

Um dieses HaloTag *microbead display* zu realisieren, sollte zunächst die Einzelmolekül PCR in Wasser-in-Öl-Emulsion getestet werden. In ersten Vorexperimenten konnte eine Amplifikation von Matrizen DNA auf der Oberfläche von *microbeads* in Wasser-in-Öl-Emulsion mittels emPCR und optimierter emPCR nachgewiesen werden (Abbildung 4.5 und 4.6). Eine Einzelmolekül PCR konnte hingegen nicht nachgewiesen werden (4.2.1). Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass zu große Mengen an Matrizen DNA in der emPCR eingesetzt wurden und jedes Kompartiment der Wasser-in-Öl-Emulsion somit statistisch mehr als ein DNA Molekül aufwies. Wäre dies der Fall, würde man erwarten, dass fast alle *microbeads* in der FAC Analyse eine Verschiebung der relativen Fluoreszenzen FL1 und FL4 aufweisen. Abbildung 4.6 B zeigt jedoch, dass der größte Teil der *microbeads* nach emPCR keine Fluoreszenz aufweist. Eine andere Ursache könnte sein, dass die einzelnen Kompartimente der Wasser-in-Öl-Emulsion nicht gleichmäßig geformt sind. Somit würden in der Emulsion viele kleine Kompartimente vorliegen, die kein Matrizen DNA Molekül bzw. kein *microbead* beinhalten, sowie einige wenige große Kompartimente in denen eine Vielzahl an sowohl DNA Matrizen als auch *microbeads* zu finden wären. Diese Ursache könnte die in Abbildung 4.6 B dargestellte FAC Analyse erklären.

Eine weitere Ursache könnte sein, dass eine Einzelmolekül PCR zwar stattgefunden hat, es jedoch während des Aufbrechens der Emulsion zur Akkumulation von *microbeads* gekommen ist. Hierbei könnten Aggregationen mehrerer *microbeads*, auf denen eine Amplifikation stattgefunden hat die in Abbildung 4.6 B dargestellte FAC Analyse erklären.

In zweiten Schritt des HaloTag *microbead display* werden die mit der Matrizen DNA dekorierten *microbeads* zur zellfreien Proteinexpression in IVC eingesetzt. Die zellfreie Proteinexpression von immobilisierter Matrizen DNA auf *microbeads* wurde zunächst ohne IVC getestet (4.2.3). Die Orientierung der auf den *microbeads* immobilisierten Matrizen DNA stellte sich hierbei als äußerst kritisch heraus (Tabelle 4.1). Eine gute Proteinexpression wurde erzielt, wenn die DNA Matrize über das 3 Ende des kodierenden DNA Strangs immobilisiert wurde. Wurde die Matrizen DNA über das 5 Ende des kodierenden DNA Strangs auf dem *microbeads* immobilisiert, so war die Proteinexpression zu gering um eindeutig nachgewiesen werden zu können. Der Einfluss der Orientierung von Matrizen DNA auf die Proteinexpression ist vermutlich auf die sterische Zugänglichkeit der Promotorregion zurückzuführen. Eine zellfreie Proteinexpression von immobilisierter Matrizen DNA auf *microbeads* in Wasser-in-Öl-Emulsion konnte ebenfalls nachgewiesen werden (4.2.2).

Das in Abbildung 4.3 dargestellte HaloTag *microbead display* setzt eine Co-Immobilisierung von Matrizen DNA und Proteinprodukt auf der *microbead* Oberfläche voraus. Um diese Co-Immobilisation zu testen, wurden *microbeads* sowohl mit Matrizen DNA als auch mit dem HaloTag Liganden dekoriert und zur zellfreien Proteinexpression eingesetzt (4.2.3). Die FAC Analyse der *microbeads* (Abbildung 4.8) lässt darauf schließen, dass keine Co-Immobilisation stattgefunden hat. Weiter konnten die im Überstand befindlichen sGFP-HaloTag Fusionsproteine über den HaloTag-Biotin Liganden erfolgreich auf der Oberfläche von *microbeads* immobilisiert und im FAC nachgewiesen werden (Abbildung 4.9). Dies zeigt zum einen, dass die Fusionsproteine funktionell exprimiert wurden und dass es möglich ist diese auf *microbeads* zu immobilisieren und mittels FAC nachzuweisen. Die Immobilisierung der Matrizen DNA und des HaloTag Liganden auf den *microbeads* erfolgte zeitgleich, wobei die Konzentration des HaloTag Liganden ca. 100-mal höher war. Da vermutet wurde, dass eine Co-Immobilisierung von Matrizen DNA und HaloTag Fusionsprotein aufgrund sterischer Behinderung nicht möglich ist, wurde die eingesetzte DNA Menge von 1,5 µg auf 0,2 µg reduziert. Die Proteinexpression von sGFP-HaloTag Fusionsproteinen konnte im Überstand

---

gerade noch nachgewiesen werden. Eine Co-Immobilisierung von Matrizen DNA und Fusionsprotein auf den *microbeads* konnte hingegen nicht gezeigt werden. Wurde die eingesetzte DNA Menge weiter auf 60 ng reduziert, so war kein Nachweis des Proteinprodukts mehr möglich. Eine Co-Immobilisierung von Matrizen DNA und Proteinprodukten auf *microbeads* konnte demnach nicht erzielt werden.

Die Vorexperimente haben gezeigt, dass ein HaloTag *microbead display* wie in Abbildung 4.3 dargestellt vermutlich nicht durchführbar ist. Sowohl eine Einzelmolekül PCR in Wasser-in-Öl-Emulsion (4.2.1), als auch die Co-Immobilisierung von Matrizen DNA und HaloTag Fusionsproteinen auf *microbeads* (4.2.3) konnten nicht nachgewiesen werden. Um ein HaloTag *microbead display* doch noch zu erzielen, wären mehrere Veränderungen erforderlich. Zum einen müsste die emPCR weiter optimiert werden, zum Beispiel durch Veränderung der Zusammensetzung des Emulsionsöls oder des Herstellungsprozesses der Wasser-in-Öl-Emulsion. Zum anderen müsste die Genotyp-Phänotyp-Kopplung dahingegen verändert werden, dass keine Co-Immobilisierung von Matrizen DNA und Proteinprodukt auf der *microbead* Oberfläche mehr erforderlich ist. Dies könnte zum Beispiel durch modifizierte Primer erzielt werden, die den HaloTag Linker beinhalten. In diesem Falle wäre die Matrize über das 5 Ende des nichtkodierenden DNA Strangs auf den *microbeads* immobilisiert, während das HaloTag Fusionsprotein an den HaloTag Liganden am 5 Ende des kodierenden DNA Strangs kovalent gebunden wäre. Eine funktionelle Einzelmolekül PCR in Wasser-in-Öl-Emulsion wäre hierbei jedoch immer noch erforderlich.

### 4.3 HaloTag-DNA-display

Nachdem das HaloTag *microbead display* aus unterschiedlichen Gründen nicht erfolgreich umgesetzt werden konnte, wurde versucht ein alternatives multivalentes System zur *in vitro* Genotyp-Phänotyp-Kopplung basierend auf der HaloTag-Technologie zu etablieren. Eine robuste Genotyp-Phänotyp-Kopplung ermöglichen die in Abschnitt 1.2.2 beschriebenen DNA *display* Systeme. Im Folgenden wurde versucht die HaloTag-Technologie mit dem DNA *display* zu kombinieren und ein kovalentes HaloTag-DNA-*display* zu entwickeln.

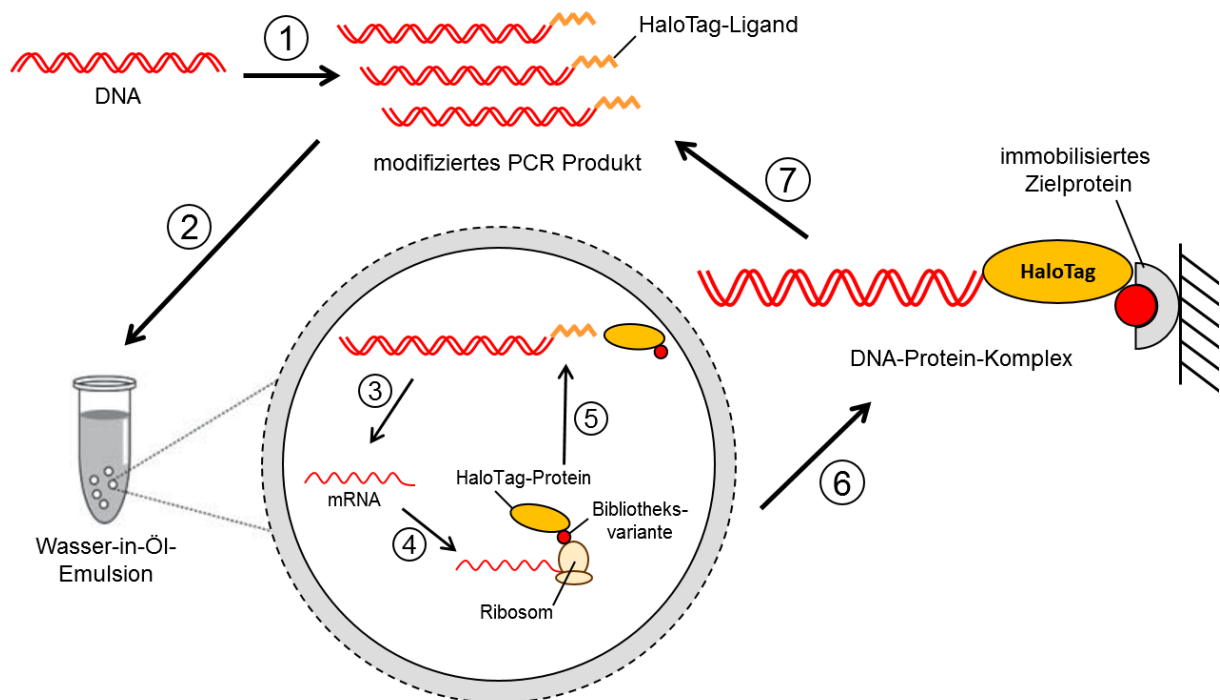


Abbildung 10: Schematische Darstellung des HaloTag-DNA-display.

1) DNA, die für ein Fusionsprotein aus HaloTag und Peptid- bzw. Proteinbibliothek kodiert wird durch eine PCR amplifiziert. Hierbei werden durch modifizierte Oligonukleotid Primer die HaloTag-Liganden in die PCR Produkte eingebaut. 2) Die modifizierten PCR Produkte werden als Matrizen-DNA in einem *in vitro* Expressionssystem eingesetzt und durch IVC vereinzelt. 3) In den einzelnen Wasser-in-Öl Kompartimenten wird die Matrizen-DNA in mRNA transkribiert und 4) dies in HaloTag-Fusionsbindepoteine translatiert. 5) Die neu synthetisierten HaloTag-Fusionsbindepoteine binden an den HaloTag-Liganden des Matrizen-DNA Moleküls, wodurch ein DNA-Protein-Komplex gebildet wird. 6) Die Wasser-in-Öl-Emulsion wird aufgebrochen und die DNA-Protein-Komplexe werden zur Selektion auf Bindung eines immobilisierten Zielmoleküls eingesetzt. Nichtbindende Komplexe werden durch Waschen entfernt. 7) Der Genotyp der selektierten Proteinvarianten wird durch PCR amplifiziert, wobei das PCR Produkt durch Verwendung von modifizierten Oligonukleotid Primer direkt in einer weiteren Selektionsrunde eingesetzt werden kann.

Bei diesem System wird der HaloTag-Ligand über einen modifizierten Oligonukleotid Primer mittels PCR in die Matrizen-DNA eingefügt. Diese DNA wird zur zellfreien Proteinexpression in einer Wasser-in-Öl-Emulsion eingesetzt. Die eingesetzte Menge an Matrizen-DNA wird dabei so gewählt, dass sich statistisch nur ein Molekül Matrizen-DNA pro Wasser Kompartiment befindet. Diese Matrizen-DNA wird nun zunächst in mRNA transkribiert, welche im nächsten Schritt in HaloTag-Fusionsprotein translatiert wird. Dieses neusynthetisierte HaloTag-Fusionsprotein bindet an den, an der Matrizen-DNA befindlichen HaloTag-Liganden, wodurch eine kovalente Verknüpfung zwischen Matrizen-DNA und Fusionsprotein entsteht. Nach dem Aufbrechen der Emulsion können die DNA-Protein-Komplexe zur Selektion auf Bindungseigenschaften des Fusionsproteins eingesetzt werden. Die einzelnen Schritte des HaloTag-DNA-display sind in Abbildung 4.10 schematisch dargestellt.

Dieses System erfordert zunächst die Kopplung des HaloTag-Liganden an das 5'-Ende des zu verwendenden Oligonukleotids. Zudem muss eine geeignete Matrizen-DNA generiert werden, welche die Sequenz des HaloTag-Proteins sowie eine zur Selektion verwendbare Sequenz beinhaltet. Anschließend muss nachgewiesen werden, dass es während der Proteinexpression zur Bildung von DNA-Protein-Komplexen kommt. Weiter ist ein Test des HaloTag-DNA-*displays* erforderlich, in dem die Genotyp-Phänotyp-Kopplung nachgewiesen werden kann.

#### 4.3.1 Generierung modifizierter Oligonukleotide

Zur Vorbereitung des HaloTag-DNA-*displays* wurde zunächst ein Oligonukleotid hergestellt, das mit dem HaloTag-Liganden modifiziert wurde. Hierfür wurde ein Oligonukleotid erworben, das bereits eine Amino-Gruppe am 5'-Ende trägt. Zur Konjugation wurde der HaloTag® Succinimidyl Ester (O4)-Ligand verwendet, welcher eine N-Hydroxysuccinimid (NHS-Ester)-Funktion beinhaltet. Die NHS-Ester-Gruppe des Liganden reagiert hierbei mit der Aminogruppe des Oligonukleotids, wodurch eine Amid-Bindung ausgebildet wird (Abbildung 4.11).

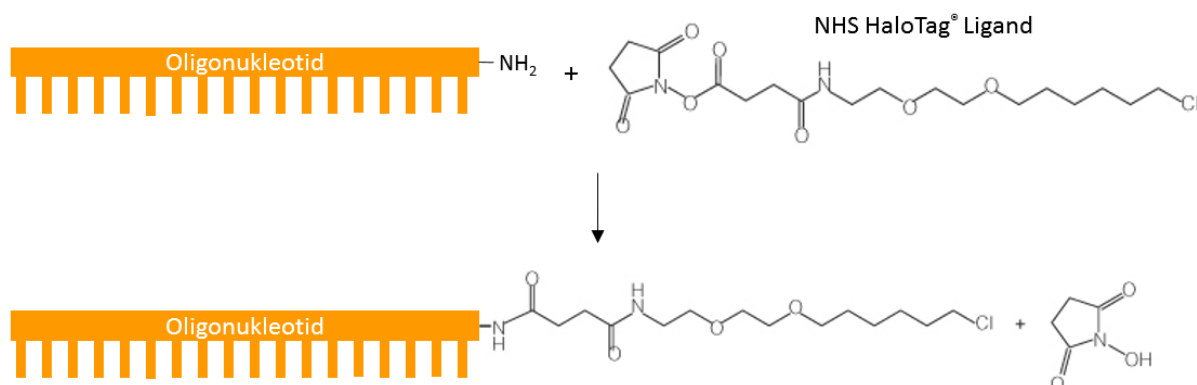


Abbildung 4.11: Schematische Darstellung der Konjugation von Oligonukleotid und HaloTag-Liganden. Die Amino-Gruppe am 5'-Ende des Oligonukleotids reagiert mit der NHS-Ester-Gruppe des HaloTag-Liganden unter Ausbildung einer Amid-Bindung.

Zur Konjugation von Oligonukleotiden mit HaloTag-Liganden wurde das Amino-universal-up Oligonukleotid verwendet (3.2.11). Der Reaktionsansatz wurde durch elektrophoretische Auftrennung in einem Polyacrylamidgel analysiert (3.2.3.2). Zur Kontrolle der Konjugation wurde gleichzeitig die gleiche Menge des unbehandelten Amino-universal-up Oligonukleotids aufgetragen. Die Analyse zeigte eine fast vollständige Konjugation des Oligonukleotids mit dem HaloTag-Liganden (Abbildung 4.12). Die modifizierten Oligonukleotide wurden gereinigt (3.2.12) und die Konzentration auf 50  $\mu$ M bestimmt (3.2.2).

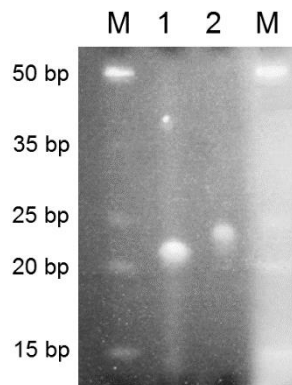


Abbildung 4.12: Analyse der Konjugation von Amino-universal-up Oligonukleotid und HaloTag-Liganden. Polyacrylamidgelelektrophorese von Amino-universal-up Oligonukleotid (1) und Konjugationsansatz von Amino-universal-up Oligonukleotid und HaloTag-Liganden (2). Die Verschiebung der Laufhöhe lässt auf eine fast vollständige Konjugation von Amino-universal-up Oligonukleotid und HaloTag-Liganden schließen. Das Gel enthielt einen Acrylamid-Anteil von 12 % (v/v). (M) Ultra Low Range DNA Marker.

#### 4.3.2 Herstellung geeigneter Matrizen-DNA für das HaloTag-DNA-*display*

Das HaloTag-DNA-*display* macht eine Reamplifikation des Genotyps nach Selektion mittels PCR erforderlich. Um eine erfolgreiche Amplifikation der DNA-Matrize in ersten sondierenden Experimenten zu gewährleisten, sollte daher eine möglichst kurze Matrizen-DNA für das HaloTag-DNA-*display* verwendet werden. Die bereits existierenden DNA-Matrizen sGFP-HaloTag-MP und sGFP-HaloTag-myc sind aufgrund ihrer Größe (ca. 2000 bp) hierfür nicht geeignet. Daher wurde aus den beiden Expressionsvektoren pET22b-sGFP-HaloTag-MP und pET22b-sGFP-HaloTag-myc das sGFP-Gen eliminiert. Die Sequenz des 5 Endes der kodierenden Region des mRNA-Transkripts kann durch Ausbildung von Sekundärstrukturen eine schlechte Proteinexpression zur Folge haben. Für eine gute Expression ist oft eine Optimierung der ca. ersten zehn Kodons erforderlich (Schwarz *et al.*, 2007; Kralicek *et al.*, 2011, Haberstock *et al.*, 2012). Aufgrund dessen wurde in den DNA-Matrizen für das HaloTag-DNA-*display* die Sequenz der ersten zehn Aminosäuren des sGFP-Gens beibehalten. Hierfür wurden die Expressionsvektoren pET22b-ΔsGFP-HaloTag-MP und pET22b-ΔsGFP-HaloTag-myc generiert, und als Matrizen-DNA in einer PCR mit den Primern pET22-up-univ-lo und pET22-lo-univ-up eingesetzt. Im Anschluss wurde über eine weitere PCR mit dem modifizierten HaloTag-Ligand-Amino-universal-up Primer und dem universal-lo Primer der HaloTag-Ligand an das 3'-Ende der Matrizen-DNA eingeführt. Die hierbei entstandenen Konstrukte ΔsGFP-HaloTag-MP-HaloTag-Ligand und ΔsGFP-HaloTag-myc-HaloTag-Ligand wurden in den weiteren Versuchen als Matrizen-DNA eingesetzt.



### 4.3.3 Nachweis der Bildung von DNA-Protein-Komplexen

Im Folgenden sollte die Ausbildung von DNA-Protein-Komplexen während der zellfreien Proteinexpression nachgewiesen werden. Hierzu wurde ein Mischungsexperiment durchgeführt in dem die Varianten getrennt voneinander expremiert und in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt wurden. Anschließend wurde auf die weniger enthaltene Variante selektiert. Zur individuellen Analyse der nach Selektion vorliegenden Varianten ist zunächst eine Klonierung in Bakterienzellen erforderlich. Einzelne Varianten können hiernach mittels PCR analysiert werden. Kommt es während der zellfreien Proteinexpression zu einer Ausbildung von kovalenten DNA-Protein-Komplexen, so ist eine Anreicherung der selektierten Variante zu erwarten. Das Mischungsexperiment ist in Abbildung 4.13 schematisch dargestellt.

Hierzu wurden die Konstrukte  $\Delta$ S-GFP-HaloTag-MP-HaloTag-Ligand und  $\Delta$ S-GFP-HaloTag-myc-HaloTag-Ligand als DNA-Matrizen zur zellfreien Proteinexpression (3.4.3) eingesetzt. Im Anschluss wurden die Expressionslösungen 1:10 sowie 1:100 ( $\Delta$ S-GFP-HaloTag-myc zu  $\Delta$ S-GFP-HaloTag-MP Variante) in sGFP Puffer gemischt. Eine Selektion des  $\Delta$ S-GFP-HaloTag-myc Fusionsproteins auf Bindung des, auf *microbeads* immobilisierten anti-myc-Antikörpers wurde durchgeführt (3.4.5). Der Genotyp der selektierten DNA-Protein-Komplexe wurde durch PCR (3.2.7.1) amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel analysiert (3.2.3.1) und die entsprechende DNA Bande durch Gelextraktion gereinigt (3.2.4). Unter Verwendung des *CloneJET<sup>TM</sup> PCR Cloning Kit* wurde das PCR-Produkt in den pJET Vektor eingebracht und dieser zur Transformation von elektrisch kompetenten *E. coli* XL-1 Blue Zellen mittels Elektroporation (3.1.5) eingesetzt.



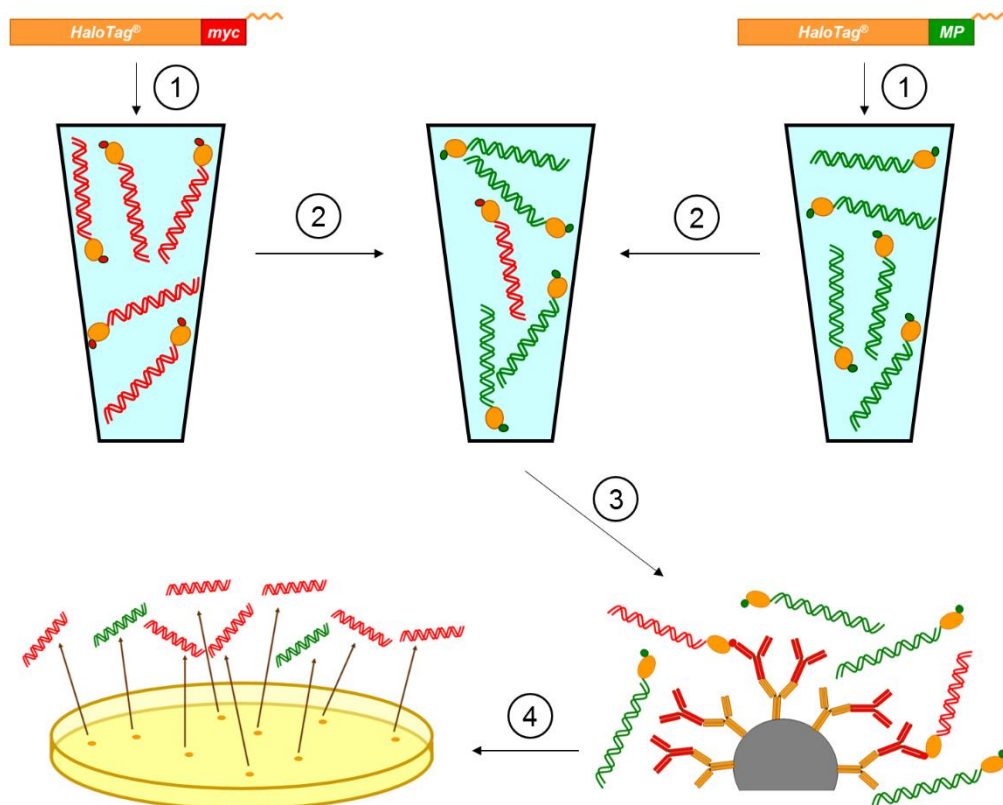


Abbildung 4.13: Schematische Darstellung des Mischungsexperiments zum Nachweis der Bildung von DNA-Protein-Komplexen.

1) Die zuvor mittels PCR generierten Varianten werden als Matrizen-DNA getrennt in zellfreien Proteinexpressionen eingesetzt. Das neusynthetisierte HaloTag-Fusionsprotein bindet kovalent an den, in der Matrizen-DNA enthaltenen HaloTag-Liganden. 2) Die Expressionsansätze werden gemischt, wobei hauptsächlich die MP-Variante vorliegt. 3) Die PRM-Komplexe werden auf Bindung des, auf *microbeads* immobilisierten anti-myc-Antikörpers selektiert. 4) Der selektierte Genotyp wird mittels PCR amplifiziert und in *E. coli* Zellen eingebracht. Einzelne Kolonien werden auf ihren Genotyp mittels PCR analysiert.

Die Transformanten wurden über Nacht kultiviert und einzelne Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR (3.2.7.3) mit den Primern T7-Promotor-up und T7-Terminator-lo auf das Vorhandensein des insertierten DNA-Fragments hin untersucht. Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel analysiert (3.2.3.1). In einer weiteren Kolonie-PCR (3.2.7.3) mit den Primern myc-screen-up bzw. MP-screen-up und T7-Terminator-lo wurden 20 der positiv getesteten Klone der 1:10 und 1:100 Mischung dahingehend untersucht, ob sie die  $\Delta$ S GFP-HaloTag-myc oder  $\Delta$ S GFP-HaloTag-MP Variante beinhalten. Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel analysiert (Abbildung 4.14).

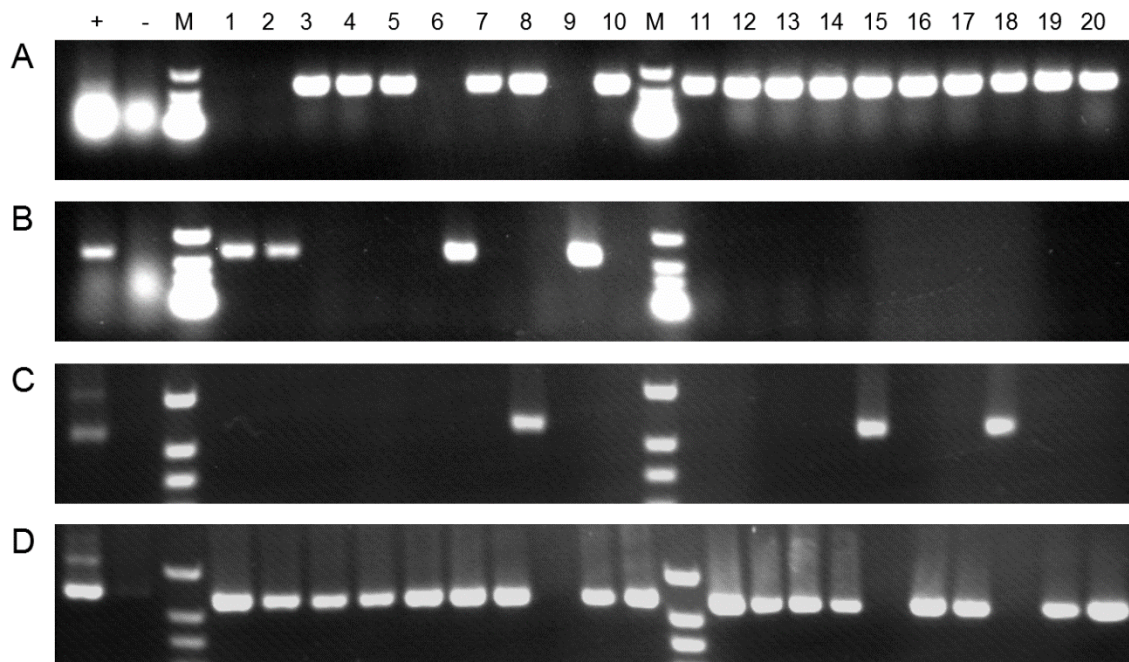


Abbildung 4.14: Genotypanalyse der selektierten DNA-Protein-Komplexe aus 1:10 und 1:100 Mischungen. Analyse der Kolonie-PCR mit myc bzw. MP spezifischen Primern nach Selektion auf myc Epitop enthaltende DNA-Protein-Komplexe von 1:10 und 1:100 Mischungen ( $\Delta$ S-GFP-HaloTag-myc zu  $\Delta$ S-GFP-HaloTag-MP Variante) nach zellfreier Proteinexpression. (A) myc spezifische Kolonie PCR der 1:10 Mischung; (B) MP spezifische Kolonie PCR der 1:10 Mischung; (C) myc spezifische Kolonie PCR der 1:100 Mischung; (D) MP spezifische Kolonie PCR der 1:100 Mischung. (+) Positivkontrolle, PCR auf pET22b- $\Delta$ S-GFP-HaloTag-MP oder pET22b- $\Delta$ S-GFP-HaloTag-myc; (-) Negativkontrolle, PCR auf pET22b- $\Delta$ S-GFP-HaloTag-MP oder pET22b- $\Delta$ S-GFP-HaloTag-myc; (M) *Ultra Low Range DNA Marker*.

Die Analyse der Kolonie-PCR (Abbildung 4.14) zeigte, dass von der 1:10 Mischung der zellfreien Proteinexpressionslösungen von myc zu MP beinhaltender Matrizen-DNA nach Selektion auf Fusionsproteine mit myc-Epitop 16 von 20 analysierten Klonen den  $\Delta$ S-GFP-HaloTag-myc Genotyp beinhalten (Abbildung 4.14 A). Die anderen 4 der 20 analysierten Klone beinhalten den im Überschuss eingesetzten  $\Delta$ S-GFP-HaloTag-MP Genotyp (Abbildung 4.14 B). Aus der 1:100 Mischung wiesen 3 von 20 analysierten Klonen den  $\Delta$ S-GFP-HaloTag-myc Genotyp auf (Abbildung 4.14 C), die anderen 17 der 20 untersuchten Kolonien beinhalteten den  $\Delta$ S-GFP-HaloTag-MP Genotyp (Abbildung 4.14 D). Dies entspricht einer 40-fachen Anreicherung des  $\Delta$ S-GFP-HaloTag-myc Genotyps aus der 1:10 Mischung sowie einer 17-fachen Anreicherung des  $\Delta$ S-GFP-HaloTag-myc Genotyps aus der 1:100 Mischung. Es ist daher davon auszugehen, dass es während der zellfreien Proteinexpression von HaloTag-Fusionsproteinen aus HaloTag-Ligand beinhaltender Matrizen-DNA zur Bildung von kovalenten DNA-Protein-Komplexen kommt.

#### 4.3.4 Nachweis der Genotyp-Phänotyp-Kopplung im HaloTag-DNA-*display*

Nachdem die Bildung von DNA-Protein-Komplexen gezeigt werden konnte, soll im Folgenden untersucht werden, ob mit dem HaloTag-DNA-*display* eine Genotyp-Phänotyp-Kopplung erzielt werden kann. Hierzu wurde ein weiteres Mischungsexperiment durchgeführt, in dem die Varianten zuerst in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt und anschließend exprimiert wurden.

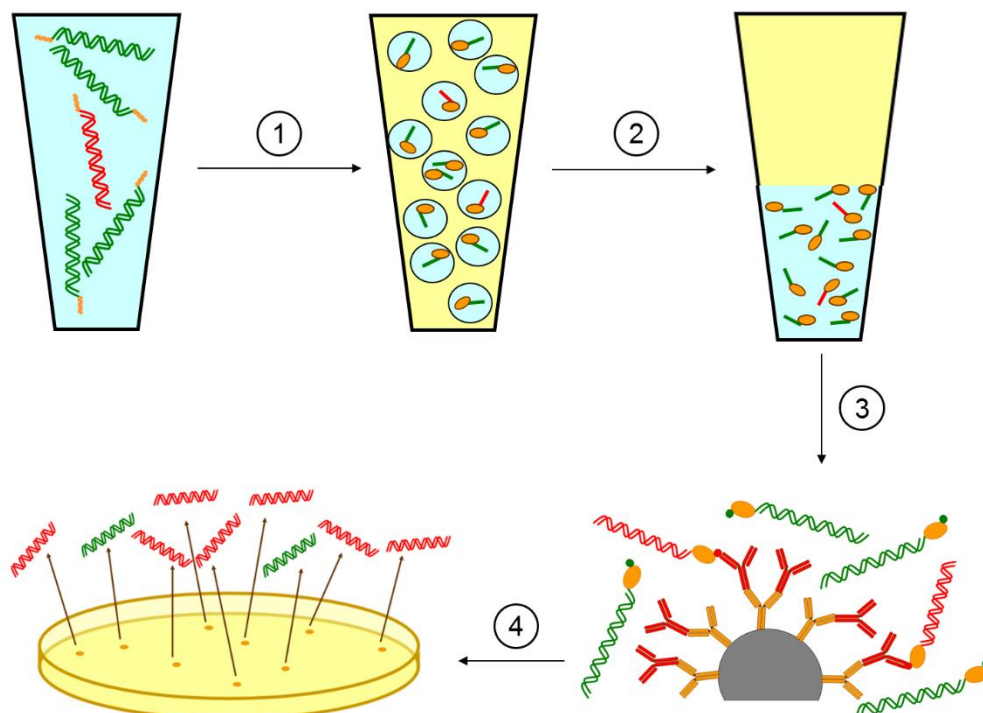


Abbildung 4.15: Schematische Darstellung des Mischungsexperiments zum Nachweis der Genotyp-Phänotyp-Kopplung.

1) Die zuvor mittels PCR generierten Varianten werden gemischt und als Matrizen-DNA in einer zellfreien Proteinexpression in Wasser-in-Öl-Emulsion eingesetzt. 2) In den einzelnen Kompartimenten binden die neu synthetisierten HaloTag-Fusionsproteine kovalent an den, in der Matrizen-DNA enthaltenen HaloTag-Liganden. 3) Die Emulsion wird aufgebrochen und die PRM-Komplexe werden auf Bindung des, auf *microbeads* immobilisierten anti-myc-Antikörpers selektiert. 4) Der selektierte Genotyp wird mittels PCR amplifiziert und in *E. coli* Zellen eingebracht. Einzelne Kolonien werden auf ihren Genotyp mittels PCR analysiert.

Um eine Genotyp-Phänotyp-Kopplung zu erzielen, wurde die zellfreie Proteinexpression in Wasser-in-Öl Emulsion durchgeführt. Die eingesetzte Menge an DNA-Matrize wurde dabei so gewählt, dass sich statistisch nur ein Molekül DNA-Matrize pro Wasser Kompartiment befinden sollte. Nach dem Aufbrechen der Emulsion wurden die hierbei gebildeten DNA-Protein-Komplexe zur Selektion der in geringeren Mengen vorliegenden Variante eingesetzt. Die selektierten Varianten wurden wie in dem vorangegangenen Mischungsexperiment zunächst

---

kloniert und anschließend analysiert. Das Mischungsexperiment zum Nachweis der Genotyp-Phänotyp-Kopplung ist schematisch in Abbildung 4.15 gezeigt.

Für das Mischungsexperiment wurden die durch PCR generierten DNA-Matrizen  $\Delta$ sGFP-HaloTag-MP-HaloTag-Ligand und  $\Delta$ sGFP-HaloTag-myc-HaloTag-Ligand (4.3.2) zunächst 1:10 sowie 1:100 gemischt. Im Anschluss wurden je 50 ng Matrizen DNA in einer zellfreien Proteinexpression in Wasser-in-Öl Emulsion (3.4.4) eingesetzt. Nach dem Aufbrechen der Emulsion wurden die myc Epitop enthaltenden DNA-Protein-Komplexe auf Bindung des auf *microbeads* immobilisierten anti-myc-Antikörpers selektiert (3.4.5). Der nun auf den *microbeads* immobilisierte Genotyp wurde durch PCR (3.2.7.1) amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel analysiert (3.2.3.1) und die entsprechende DNA-Bande durch Gelextraktion gereinigt (3.2.4). Unter Verwendung des *CloneJET<sup>TM</sup> PCR Cloning Kit* wurden die Varianten in den pJET Vektor eingebracht. Elektrisch kompetente *E. coli* XL-1 Blue Zellen wurden mittels Elektroporation (3.1.5) mit den pJET Vektoren transformiert und über Nacht kultiviert. Einzelne Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR (3.2.7.3) mit den Primern T7-Promotor-up und T7-Terminator-lo auf das Vorhandensein des insertierten DNA-Fragments hin untersucht. In einer weiteren Kolonie-PCR (3.2.7.3) mit den Primern myc-screen-up bzw. MP-screen-up und T7-Terminator-lo wurden 20 der positiv getesteten Klone der 1:10 und 1:100 Mischung dahingehend untersucht, ob sie die  $\Delta$ sGFP-HaloTag-myc oder  $\Delta$ sGFP-HaloTag-MP Variante beinhalten. Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel analysiert (3.2.3.1) (Abbildung 4.16).

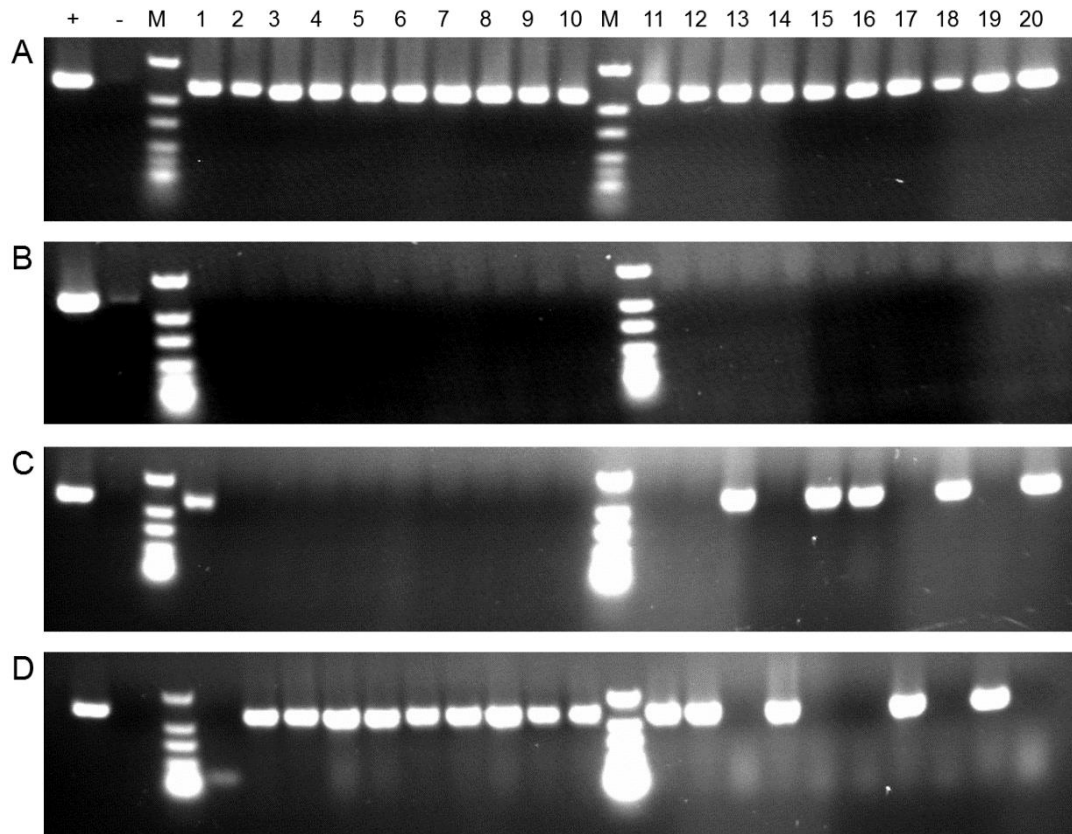


Abbildung 4.16: Genotypanalyse der selektierten DNA-Protein-Komplexe aus 1:10 und 1:100 Mischungen zum Nachweis der Genotyp-Phänotyp-Kopplung.

Analyse der Kolonie-PCR mit myc bzw. MP spezifischen Primern nach Selektion auf myc Epitop enthaltende DNA-Protein-Komplexe von 1:10 und 1:100 Mischungen ( $\Delta$ S-GFP-HaloTag-MP-HaloTag-Ligand zu  $\Delta$ S-GFP-HaloTag-myc-HaloTag-Ligand) vor zellfreier Proteinexpression. (A) myc spezifische Kolonie-PCR der 1:10 Mischung; (B) MP spezifische Kolonie-PCR der 1:10 Mischung; (C) myc spezifische Kolonie-PCR der 1:100 Mischung; (D) MP spezifische Kolonie-PCR der 1:100 Mischung. (+) Positivkontrolle, PCR auf pET22b- $\Delta$ S-GFP-HaloTag-MP oder pET22b- $\Delta$ S-GFP-HaloTag-myc; (-) Negativkontrolle, PCR auf pET22b- $\Delta$ S-GFP-HaloTag-MP oder pET22b- $\Delta$ S-GFP-HaloTag-myc; (M) Ultra Low Range DNA Marker.

Die Analyse der Kolonie-PCR (Abbildung 4.16) zeigte, dass von der 1:10 Mischung von myc zu MP beinhaltender Matrizen-DNA nach zellfreier Proteinexpression in Wasser-in-Öl-Emulsion und Selektion auf Fusionsproteine mit myc-Epitop 20 von 20 analysierten Klonen den  $\Delta$ S-GFP-HaloTag-myc Genotyp beinhalten (Abbildung 4.16 A). Keiner der 20 analysierten Klone wies den im Überschuss eingesetzten  $\Delta$ S-GFP-HaloTag-MP Genotyp auf (Abbildung 4.16 B). Aus der 1:100 Mischung wiesen 6 von 20 analysierten Klonen den  $\Delta$ S-GFP-HaloTag-myc Genotyp auf (Abbildung 4.16 C), die anderen 14 der 20 untersuchten Kolonien beinhalteten den  $\Delta$ S-GFP-HaloTag-MP Genotyp (Abbildung 4.16 D). Dies entspricht einer 200-fachen Anreicherung des  $\Delta$ S-GFP-HaloTag-myc Genotyps aus der 1:10 Mischung, sowie einer 43-fachen Anreicherung des  $\Delta$ S-GFP-HaloTag-myc Genotyps aus der 1:100 Mischung. Die erfolgreiche Anreicherung des  $\Delta$ S-GFP-HaloTag-myc Genotyps in den Mischungsexperimenten des HaloTag-



---

DNA-*displays* zeigt, dass es während der zellfreien Proteinexpression in Wasser-in-Öl-Emulsion zur Ausbildung einer stabilen Genotyp-Phänotyp-Kopplung kommt.

#### 4.3.5 Diskussion

DNA *display* Systeme stellen eine robuste Kopplung von Genotyp und Phänotyp dar (Doi & Yanagawa, 1999, Bertschinger & Neri, 2004, Bertschinger *et al.*, 2007; Stein *et al.*, 2007, Kaltenbach & Hollfelder, 2012). Mit Hilfe der HaloTag-Technologie konnte ein weiteres DNA *display* System etabliert werden. Zur Vorbereitung wurde ein Oligonukleotid generiert, das mit dem HaloTag-Liganden über eine Amid-Bindung konjugiert ist. Die Konjugation konnte erfolgreich durchgeführt und das modifizierte Oligonukleotid gereinigt und regeneriert werden (4.3.1). Eine geeignete DNA-Matrize wurde unter Verwendung dieses modifizierten Oligonukleotids als Primer in einer PCR generiert (4.3.2). Zum Einsatz in den folgenden Mischungsexperimenten wurden zwei verschiedene Varianten hergestellt. Zunächst wurde die Bildung von DNA-Protein-Komplexen während der zellfreien Proteinexpression in einem Mischungsexperiment nachgewiesen (4.3.3). In diesem Mischungsexperiment wurden die beiden DNA-Matrizen-Varianten getrennt exprimiert und die Expressionslösungen wurden in verschiedenen Verhältnissen gemischt. Diese Mischungen wurden zur Selektion eingesetzt und eine Genotypanalyse der selektierten Varianten durchgeführt (Abbildung 4.13). In diesem Mischungsexperiment konnte bei einer 1:10 Mischung eine 40-fache und bei einer 1:100 Mischung eine 17-fache Anreicherung erzielt werden. Durch dieses Mischungsexperiment konnte die Bildung von DNA-Protein-Komplexen indirekt nachgewiesen werden. Zudem wurde gezeigt, dass die DNA-Protein-Komplexe erfolgreich zur Selektion auf Bindung eines auf *microbeads* immobilisierten Antikörpers eingesetzt werden können.

In einem weiteren Mischungsexperiment wurde nachgewiesen, dass eine Genotyp-Phänotyp-Kopplung durch das HaloTag DNA *display* vermittelt wird (4.3.4). In diesem Mischungsexperiment wurden die beiden DNA-Matrizen-Varianten zunächst in verschiedenen Verhältnissen gemischt und im Anschluss in einer zellfreien Proteinexpression in IVC eingesetzt. Die Menge der eingesetzten DNA-Matrize wurde hierbei so gewählt, dass ein Kompartiment der Wasser-in-Öl-Emulsion statistisch nicht mehr als ein DNA-Molekül beinhaltet und somit eine Genotyp-Phänotyp-Kopplung gewährleistet werden kann. Die Expressionslösung wurde zur Selektion eingesetzt und eine Genotypanalyse der selektierten Varianten durchgeführt

---

(Abbildung 4.12). Bei diesem Mischungsexperiment wiesen alle untersuchten Klone der Mischung 1:10 den selektierten Genotyp auf (Abbildung 4.16). Dies entspricht einer 200-fachen Anreicherung. Bei der 1:100 Mischung konnte eine 43-fache Anreicherung erzielt werden. In der Literatur wurden für ein bivalentes SNAP *display* eine 240-fache Anreicherung aus einer 1:10 Mischung beschrieben (Kaltenbach *et al.*, 2011). Mit Hilfe des HaloTag DNA *displays* konnten somit vergleichbare Anreicherungen erzielt werden.

Vergleicht man die Anreicherungsfaktoren der beiden Mischungsexperimente miteinander, so scheint die Anreicherung der Mischung der Expressionslösungen zum Nachweis der DNA-Protein-Komplexe (4.3.3) weniger erfolgreich als die Anreicherung der Expressionslösung nach IVC zum Nachweis der Genotyp-Phänotyp-Kopplung (4.3.4). Zur getrennten Expression der beiden Varianten wurde, im Vergleich zur Expression in Wasser-in-Öl-Emulsion, deutlich mehr DNA-Matrize eingesetzt (ca. 1000 fache DNA-Menge). Hieraus resultiert eine deutlich höhere Konzentration an DNA-Protein-Komplexen sowie frei vorliegenden Fusionsproteinen. Durch eine Sättigung der Bindungsstellen der zur Selektion eingesetzten Antikörper mit frei vorliegenden Fusionsproteinen lässt sich eine verringerte Anreicherungsrate erklären.

Die Analyse der selektierten Genotypen über Klonierung und Kolonie-PCR Analyse ist vergleichsweise aufwendig. Daher wurden jeweils nur 20 Kolonien untersucht. Aufgrund der geringen Anzahl untersuchter Kolonien ist die errechnete Anreicherungsrate fehlerbehaftet. Zur Quantifizierung und Analysierung aller nach Selektion vorliegender Genotypen, wäre eine *real-time*-PCR Analyse oder die vollständige Sequenzierung mittels *Next-Generation-Sequencing* geeignet. Diese könnte zusätzlich Aufschluss über die Wiederfindungsrate der eingesetzten Matrizen DNA geben.

#### 4.4 Selektion einer randomisierten Peptidbibliothek mittels HaloTag-DNA-display

Die vorangegangenen Mischungsexperimente haben gezeigt, dass eine Genotyp-Phänotyp-Kopplung durch das HaloTag-DNA-*display* erzielt wird. Im Weiteren wurde dieses neuentwickelte System zur Selektion einer randomisierten Peptidbibliothek auf Bindungseigenschaften eingesetzt. Hierzu wurde zunächst eine DNA-Matrize generiert, welche die Sequenzen einer randomisierten Peptidbibliothek beinhaltet. Diese DNA-Bibliothek muss dann über mehrere Runden mittels HaloTag-DNA-*display* zur Selektion auf ein geeignetes

Zielmolekül eingesetzt werden. Im Anschluss sollen die selektierten Bibliotheksmitglieder auf ihre Sequenzen und Bindungseigenschaften hin untersucht werden.

#### 4.4.1 Generierung einer randomisierten Peptidbibliothek

In der Peptidbibliothek für das HaloTag-DNA-*display* sollte die 10 Aminosäuren lange Sequenz des c-myc Epitops EQKLISEEDL in der  $\Delta$ S-GFP-HaloTag-myc Matrizen-DNA durch eine randomisierte Sequenz ersetzt werden. Hierfür wurden Primer verwendet, die für 6, 8 oder 10 randomisierte Aminosäuren kodieren. Eine Vollrandomisierung wurde durch die Wiederholung der Sequenz NNS erzielt, wobei N für jede organische Base und S für Guanin oder Cytosin steht. Die, die Bibliothek beinhaltenden Primer MP-Bib-6, MP-Bib-8 und MP-Bib-10 wurden in getrennten Reaktionsansätzen zur Amplifikation des 3 Fragment der Matrizen-DNA zusammen mit dem HaloTag-Ligand-Amino-universal-up Primer eingesetzt. Das 5 Fragment der Matrizen-DNA wurde mithilfe des Primerpaares HaloTag-SOE-lo und HaloTag-Ligand-Amino-universal-up amplifiziert. Als Matrizen-DNA zur Amplifikation der 3 und 5 Fragmente diente das  $\Delta$ S-GFP-HaloTag-MP Konstrukt. Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel analysiert (3.2.3.1) und mit Phenol und Chloroform extrahiert (3.2.5). Danach wurden die PCR-Produkte mit Natriumacetat und Isopropanol gefällt (3.2.6.2), in Wasser aufgenommen und die DNA-Konzentration bestimmt (3.2.2). Anschließend wurden die 3 und 5 Fragmente in einer SOE-PCR (3.2.7.2) zusammengefügt, wobei jeweils die dreifache Menge des 5 Fragments eingesetzt wurde. Die SOE-PCR-Produkte wurden im Agarosegel analysiert (3.2.6.2) und extrahiert (3.2.4). Die Konzentration der drei  $\Delta$ S-GFP-HaloTag-Bib Varianten wurde bestimmt, die DNA-Lösungen auf 10 ng/ $\mu$ l eingestellt und 1:1:1 gemischt. Hiernach konnte die randomisierte Peptidbibliothek zur Selektion mittels HaloTag-DNA-*display* eingesetzt werden. Da für die Amplifikation beider PCR-Fragmente das modifizierte Oligonukleotid HaloTag-Ligand-Amino-universal-up verwendet wurde, tragen jeweils beide DNA-Stränge am 5-Ende den HaloTag-Liganden. Hierdurch kann ein bivalentes HaloTag-DNA-*display* erzielt werden, da jeweils zwei HaloTag-Fusionsproteine an ein DNA-Molekül binden können. Eine schematische Darstellung der Bibliothek ist in Abbildung 4.17 gezeigt.





Abbildung 4.17: Schematische Darstellung des zum HaloTag-DNA-*display* eingesetzten  $\Delta$ sGFP-HaloTag-Bib Konstrukts.

Schematische Darstellung des Aufbaus der HaloTag-Bibliothek. Pfeil: T7-Promotorsequenz; grün: Sequenz der ersten 10 Aminosäuren des sGFP; orange: Sequenz des HaloTag-Proteins, sowie HaloTag-Liganden an den 5'-Enden der beiden DNA-Stränge; rot: Sequenz der randomisierten Mikroprotein-Bibliothek; blau: Sequenz des 6 Histidin-Tags; Balken: T7-Terminator Sequenz.

#### 4.4.2 Selektion der HaloTag-MP-Bibliothek auf Bindung des anti-myc Antikörpers

In den vorangegangenen Mischungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass mit dem HaloTag-DNA-*display* DNA-Protein-Komplexe generiert werden können (4.3.3), die eine Genotyp-Phänotyp-Kopplung darstellen (4.3.4). Im Weiteren soll untersucht werden, ob sich das HaloTag-DNA-*display* zur Selektion von Peptiden mit spezifischen Bindungseigenschaften über mehrere Selektionsrunden eignet.

Hierzu wurden ca. 50 ng  $\Delta$ sGFP-HaloTag-Bib zur zellfreien Proteinexpression in Wasser-in-Öl-Emulsion eingesetzt (3.4.4). Der zellfreie Proteinexpressionsansatz wurde zur Selektion der DNA-Protein-Komplexe auf immobilisierten anti-myc-Antikörper Bindung verwendet (3.4.5). Die selektierten Genotypen wurden durch PCR amplifiziert (3.2.7.1) und die PCR-Produkte im Agarosegel analysiert. Zur Amplifikation wurde der Primer HaloTag-Ligand-Amino-universal-up verwendet. Falls durch die PCR nicht genügend DNA amplifiziert werden konnte, so wurde das hierbei entstandene PCR-Produkt als Matrize in einer weiteren PCR eingesetzt. Im Anschluss wurden die PCR-Produkte aus dem Agarosegel eluiert (3.2.4) und die DNA-Konzentration bestimmt (3.2.2). Diese selektierte  $\Delta$ sGFP-HaloTag-Bib wurde nun in einer weiteren Selektionsrunde als Matrizen-DNA eingesetzt. Die Selektion wurde über vier Runden durchgeführt und im Anschluss wurden einzelne Bibliotheksmitglieder genauer analysiert. Die Selektion der HaloTag-Bibliothek ist in Abbildung 4.18 schematisch dargestellt.

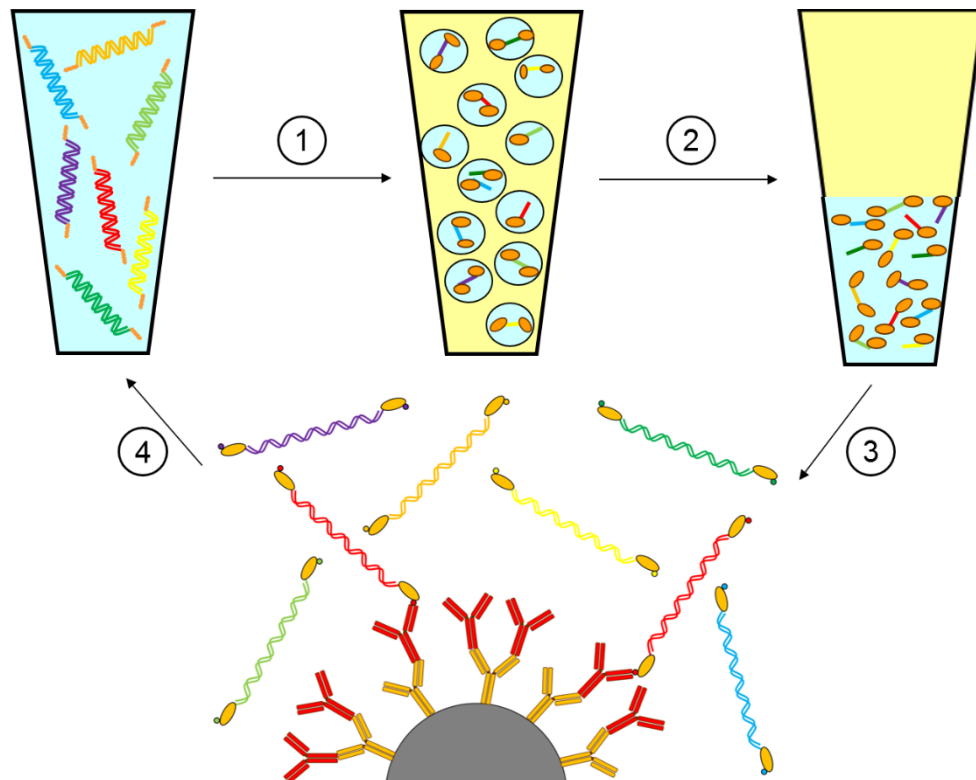


Abbildung 4.18: Schematische Darstellung der Selektion der HaloTag-Bibliothek.

1) Die HaloTag-Bibliothek wird zur zellfreien Proteinexpression in Wasser-in-Öl-Emulsion eingesetzt. 2) Die neu synthetisierten HaloTag-Fusionsproteine binden kovalent an die, an den 5'-Enden beider DNA-Stränge befindlichen HaloTag-Liganden. Hierdurch kommt es zur Ausbildung von bivalenten DNA-Protein-Komplexen. 3) Die Emulsion wird aufgebrochen, und die DNA-Protein-Komplexe zur Bindung auf immobilisierte Antikörper selektiert. Nichtbindende Bibliotheksmitglieder wurden durch Waschen entfernt. 4) Die Genotypen der selektierten DNA-Protein-Komplexe wurden mittels PCR amplifiziert und in einer weiteren Selektionsrunde als DNA-Matrize eingesetzt.

#### 4.4.3 Analyse der auf anti-myc-Antikörper Bindung selektierten HaloTag-Bib-Varianten

Im Anschluss an die vierte Selektionsrunde der HaloTag-MP-Bibliothek auf Bindung des anti-myc-Antikörpers, wurden einzelne Varianten untersucht. Hierzu wurden die selektierten Bib-Varianten in den pET22 Vektor eingebracht. Die hierbei entstandene Plasmid-DNA pET22- $\Delta$ S-GFP-HaloTag-Bib wurde zur Transformation von elektrisch kompetenten *E. coli* XL-1 Blue Zellen verwendet. Die Transformanten wurden mittels Kolonie-PCR (3.2.7.3) mit den Primern HaloTag-ende-up und T7-Terminator-lo auf das Vorhandensein des insertierten DNA-Fragments hin untersucht und die PCR-Produkte im Agarosegel analysiert (3.2.3.1). Zwölf einzelne Kolonien wurden über Nacht kultiviert (3.1.2), die Plasmid-DNA extrahiert (3.2.1) und die Konzentrationen bestimmt (3.2.2). Je ca. 150 ng Plasmid-DNA wurden als Matrize in einer zellfreien Proteinexpression mit einem Reaktionsvolumen von 25  $\mu$ l eingesetzt (3.4.3). Als Kontrollen wurden die Plasmide  $\Delta$ S-GFP-HaloTag-myc und  $\Delta$ S-GFP-HaloTag-MP in jeweils zwei

zellfreien Proteinexpressionsansätzen verwendet. Um die Bindung der HaloTag-MP-Fusionsproteine an anti-myc-Antikörper nachzuweisen, wurden *Bead-ELISA* (3.4.6) durchgeführt (Abbildung 4.19). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.20 dargestellt.

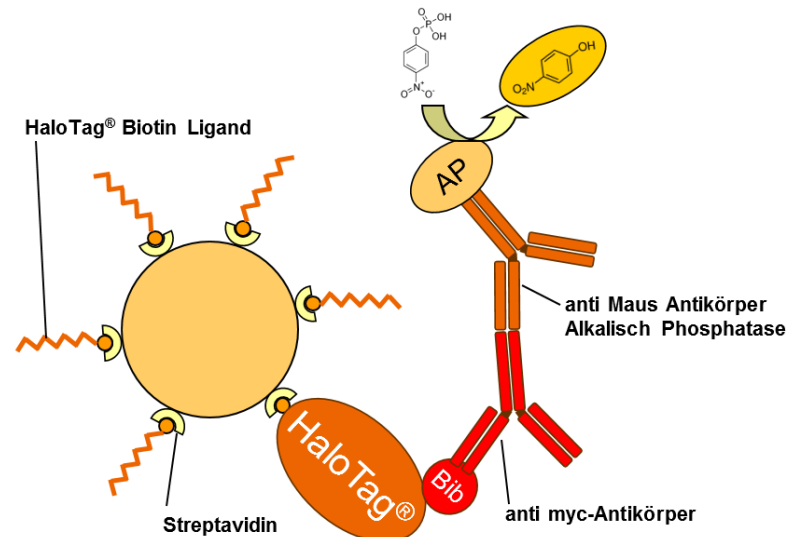


Abbildung 4.19: Schematische Darstellung des *Bead-ELISA*.

Das mittels zellfreier Proteinexpression gebildete HaloTag-Fusionsprotein wird über den HaloTag-Biotin-Liganden auf der Oberfläche von Streptavidin *microbeads* immobilisiert. Im Anschluss werden die *microbeads* zunächst mit dem primären Antikörper inkubiert, der bei erfolgreicher Selektion der Bibliothek an das Fusionsprotein bindet. Hiernach werden die *microbeads* mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Dieser ist gegen den primären Antikörper gerichtet, und mit dem Enzym alkalische Phosphatase konjugiert. Dieses Enzym setzt das farblose Substrat para-Nitrophenylphosphat in das gelbe Produkt para-Nitrophenol um. Der Farbumschlag kann anschließend photometrisch detektiert und quantifiziert werden.

Die HaloTag-Bib-Varianten 3 und 12 zeigten ein sehr starkes Signal im *Bead-ELISA*. Zur weiteren Analyse der auf anti-myc-Antikörper Bindung selektierten HaloTag-Bib-Varianten wurden die Varianten 1-5 sowie Variante 12 sequenziert. Die Sequenzanalyse zeigte, dass die Varianten 1, 2 und 4 kein MP-Gen beinhalten. Die Varianten 3 und 12 sind sequenzidentisch mit der myc-Variante und Variante 5 ist revers komplementär (sequenzidentisch) mit der myc-Variante. Die stark abweichende Signalintensität der Positivkontrolle (HaloTag-myc Variante) zu den sequenzidentischen Varianten 3 und 12 ist vermutlich auf die Qualität und Reinheit der zur zellfreien Proteinexpression eingesetzten Plasmid-DNA zurückzuführen. Da die NNS Kodierung der HaloTag-MP-Bibliothek eine Sequenzidentität mit der HaloTag-myc-Variante ausschließt, ist eine Verunreinigung der Bibliothek mit dieser Variante anzunehmen.

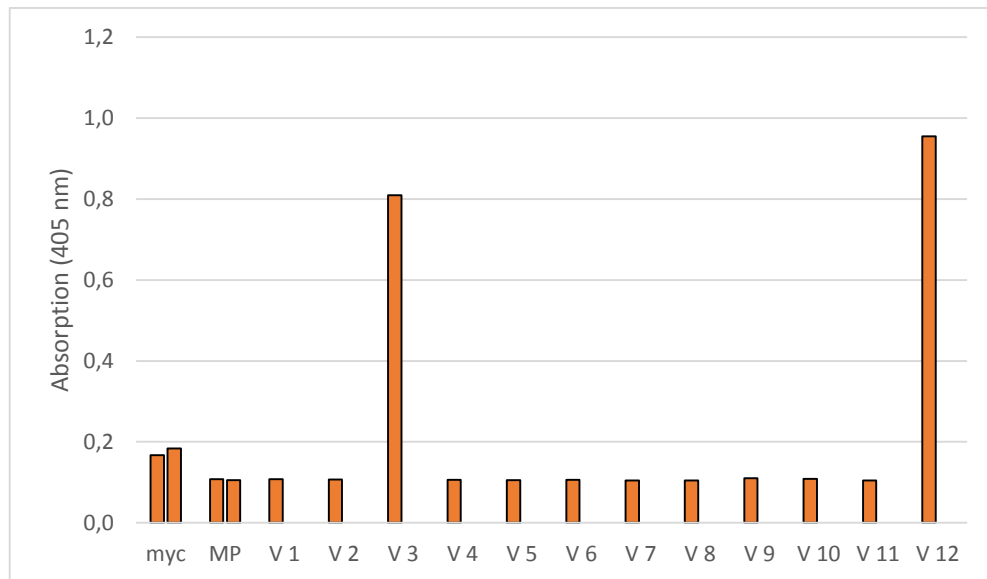


Abbildung 4.20: Untersuchung der Bindung von HaloTag-MP-Fusionsproteinen an anti-myc Antikörper mittels *Bead-ELISA*.

Myc: HaloTag-myc Variante (Positivkontrolle); MP: HaloTag-MP Variante (Negativkontrolle); V1-V12: HaloTag-Bib Varianten 1-12 aus den Kolonien 1-12.

Unklar ist hingegen, ob bereits die HaloTag-MP-Bibliothek kontaminiert war, oder ob die HaloTag-myc Variante während der Selektionsrunden eingebracht wurde. Die Selektion der HaloTag-MP-Bibliothek auf Bindung des anti-myc-Antikörpers wurde mit einer neu generierten HaloTag-MP-Bibliothek wiederholt. Um einer Verunreinigung der Bibliothek vorzubeugen, wurde das hierfür verwendete Plasmid pET22-ΔsGFP-HaloTag-MP in *E. coli* XL-1 Blue Zellen eingebracht, eine einzelne Kolonie kultiviert und die Plasmid-DNA extrahiert. Hierdurch sollte die Abwesenheit der myc-Variante gewährleistet werden. Der pET22-ΔsGFP-HaloTag-MP Vektor wurde als Matrizen-DNA zur Generierung der neuen HaloTag-MP-Bibliothek mittels PCR verwendet. Die Selektion der neuen HaloTag-MP-Bibliothek auf Bindung des anti-myc-Antikörpers wurde über drei Selektionsrunden wie beschrieben durchgeführt. Um eine eventuelle Verunreinigung der Bibliothek zu überprüfen, wurden die neue HaloTag-MP-Bib, die HaloTag-MP-Bib nach der vierten Selektionsrunde und die neue HaloTag-MP-Bib nach der dritten Selektionsrunde als Matrize in PCR mit MP- bzw. myc-spezifischen Primern eingesetzt. Hierbei zeigte sich, dass die PCR mit dem MP-spezifischen Primer nur mit der neuen HaloTag-MP Bibliothek als Matrizen-DNA ein PCR-Produkt der zu erwarteten Größe von 240 bp lieferte. Ein PCR-Produkt dieser Größe konnte mit dem myc-spezifischen Primer hingegen in allen Reaktionen nachgewiesen werden (Abbildung 4.21).

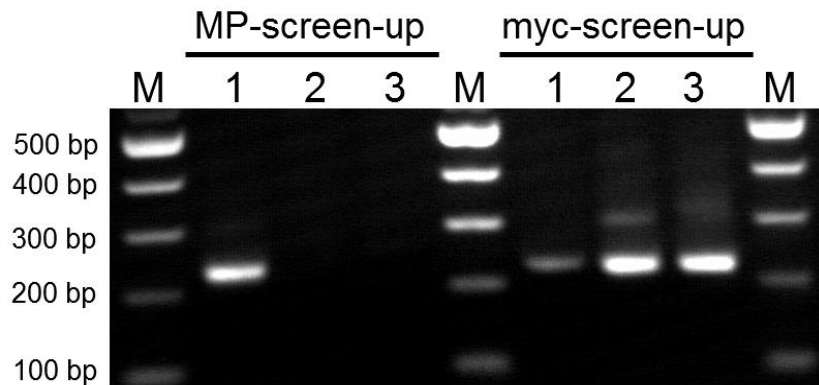


Abbildung 4.21: PCR-Analyse der HaloTag-MP-Bibliotheken mit MP- und myc-spezifischen Primern. Die PCR mit dem MP-spezifischen Primer zeigt nur bei Verwendung der neuen HaloTag-MP-Bibliothek ein PCR-Produkt von ca. 240 bp. Die PCR mit dem myc-spezifischen Primer zeigt in allen drei Reaktionen ein Produkt von ca. 204 bp. M: 2-Log DNA Marker (NEB); 1: neue HaloTag-MP-Bibliothek; 2: HaloTag-MP-Bibliothek nach 4. Selektionsrunde; 3: neue HaloTag-MP-Bibliothek nach 3. Selektionsrunde.

Da die PCR mit dem myc-spezifischen Primer bei der neuen HaloTag-MP-Bibliothek als Matrizen-DNA ein Produkt der erwarteten Größe synthetisiert wurde, ist anzunehmen, dass auch hier eine Kontamination der Bibliothek mit der HaloTag-myc Variante vorliegt. Dieser Verdacht könnte final nur durch eine Sequenzanalyse geklärt werden. Diese wurde jedoch aus Kostengründen nicht durchgeführt.

#### 4.4.4 Selektion und Analyse der HaloTag-MP-Bibliothek auf Bindung des anti-Sendai-Antikörpers

Die Selektion der HaloTag-MP-Bibliothek auf Bindung des anti-myc-Antikörpers war aufgrund einer Kontamination der Bibliothek mit der  $\Delta$ GFP-HaloTag-myc Variante nicht erfolgreich. Da die Ursache der Kontamination nicht final geklärt werden konnte, wurde ein neues Zielprotein für die Selektion der HaloTag-MP-Bibliothek verwendet. Um den experimentellen Aufbau beizubehalten, wurde ein weiterer Antikörper als Zielprotein eingesetzt. Eine Voraussetzung war, dass bisher kein HaloTag-Fusionsprotein mit Bindungseigenschaften gegen diesen Antikörper existiert. Als Zielprotein wurde der anti-Sendai-Antikörper gewählt, der das 13 Aminosäuren lange Epitop DGSGLDIEPYDSS aus dem L-Protein des Sendai Virus bindet (Einberger *et al.*, 1990). Da dieser Antikörper bereits mehrere Jahre gelagert wurde (Kulturüberstand von MAb VII-E-7 aus März 1993), wurde er zunächst auf Funktionalität überprüft. Für diesen Nachweis wurde das Protein PcrV-Sendai, welches das Sendai-Epitop beinhaltet, in einer SDS-PAGE aufgetrennt (3.3.6) und anschließend mittels Western-Blot Analyse (3.3.8) detektiert (Abbildung 4.22). In der Western-Blot Analyse konnte das

PcrV-Sendai Protein mit Hilfe des anti-Sendai-Antikörpers eindeutig nachgewiesen werden, wodurch die Funktionalität des Antikörpers bestätigt wurde.

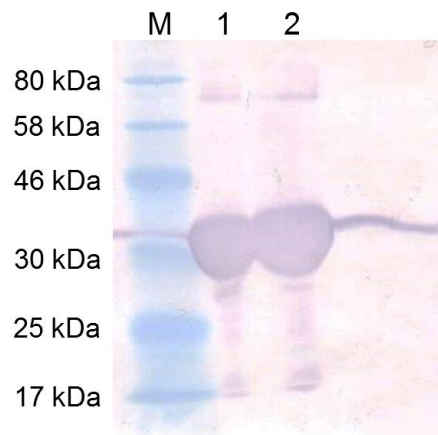


Abbildung 4.22: Western-Blot Analyse von PcrV-Sendai zum Nachweis der Funktionalität des anti-Sendai-Antikörpers. M: Größenmarker *Prestained Protein Marker, Broad Range 7-175 kDa* (NEB); 1: 5 µl PcrV-Sendai; 2: 10 µl PcrV-Sendai.

Die Selektion der HaloTag-MP-Bibliothek wurde auf Bindung des neuen Zielproteins wiederholt. Hierzu wurde der Antikörper auf paramagnetische *microbeads* immobilisiert (3.3.11) und auf diesen nachgewiesen (3.3.12). Die HaloTag-MP-Bibliothek wurde zur Selektion auf Bindung des anti-Sendai-Antikörpers mittels HaloTag-DNA-*display* eingesetzt. Es wurden fünf Selektionsrunden durchgeführt. Im Anschluss wurden die selektierten Varianten in den pET22-Vektor eingebracht und die hierbei entstandene Plasmid-DNA pET22-ΔsGFP-HaloTag-Bib zur Transformation von elektrisch kompetenten *E. coli* XL-1 Blue Zellen verwendet. Die Transformanten wurden mittels Kolonie-PCR (3.2.7.3) mit den Primern HaloTag-ende-up und T7-Terminator-lo auf das Vorhandensein des inserierten DNA-Fragments hin untersucht und die PCR-Produkte im Agarosegel analysiert (3.2.3.1). Zehn einzelne Kolonien wurden über Nacht kultiviert (3.1.2), die Plasmid-DNA extrahiert (3.2.1) und die Konzentrationen bestimmt (3.2.2). Je ca. 250 ng Plasmid-DNA wurden als Matrize in einer zellfreien Proteinexpression mit einem Reaktionsvolumen von 25 µl eingesetzt (3.4.3). Als Negativkontrolle wurde das Plasmid ΔsGFP-HaloTag-MP in zwei zellfreien Proteinexpressionsansätzen verwendet. Um die Bindung der HaloTag-MP-Fusionsproteinen an anti-Sendai-Antikörper nachzuweisen, wurden *Bead-ELISA* (3.4.6) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.23 dargestellt. Der *Bead-ELISA* der zehn Varianten nach fünf Selektionsrunden zeigt eine Absorption aller zehn Varianten im Bereich der Negativkontrolle HaloTag-MP. Eine spezifische Bindung der selektierten Varianten an den anti-Sendai-

Antikörper kann daher nicht nachgewiesen werden. Fraglich ist jedoch, ob es zu einer Anreicherung einzelner Varianten mit unspezifischen Bindungseigenschaften gekommen ist oder ob die Varianten zufällige Sequenzen beinhalten. Um diese Fragestellung genauer zu untersuchen, ist eine Sequenzanalyse der selektierten Varianten erforderlich. Werden mehrere Varianten aus unterschiedlichen Selektionsrunden sequenziert, kann dies zusätzlich Aufschluss über den Selektionsprozess geben.

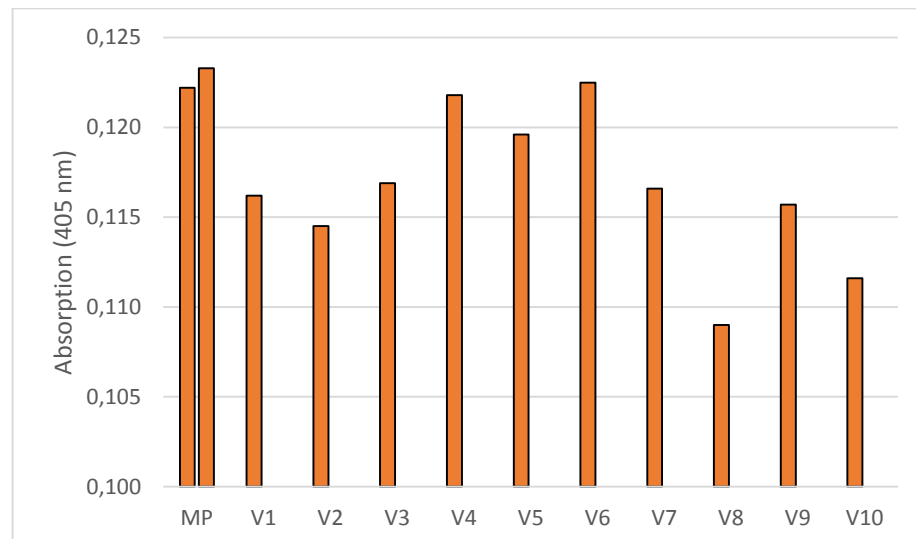


Abbildung 4.23: Untersuchung der Bindung von HaloTag-MP-Fusionsproteinen an anti-Sendai-Antikörper mittels *Bead-ELISA* nach fünf Selektionsrunden.

MP: HaloTag-MP-Variante (Negativkontrolle); V1-V10: HaloTag-Bib Varianten 1-10 aus den Kolonien 1-10.

Um genauere Erkenntnisse über die selektierten MP-Varianten zu erhalten, wurden Sequenzanalysen der Selektionsrunden 3, 4 und 5 durchgeführt. Hierzu wurde die nach Selektionsrunde 3 und 4 erhaltene MP-Bibliothek zunächst wie beschrieben in den pET22 Vektor und anschließend in *E. coli* XL-1 Blue Zellen eingebracht. Die erhaltenen Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR untersucht, die Plasmid-DNA extrahiert und anschließend je 8 Varianten sequenziert. Die Aminosäuresequenzen der Varianten der Selektionsrunden 3, 4 und 5 auf Bindung des anti-Sendai-Antikörpers sind in Abbildung 4.24 gezeigt. In den acht Sequenzanalysen der dritten Selektionsrunde wurden insgesamt drei Sequenzen in unterschiedlichen Häufigkeiten gefunden. Fünf der acht sequenzierten Varianten hatten die Sequenz WNLLVMCR, zwei die Sequenz MWTQGW und eine Variante zeigte nach der ersten randomisierten Aminosäure Aspartat ein Stoppcodon. Die Sequenzanalyse der vierten Selektionsrunde wiesen vier Varianten mit der Sequenz VGIGR und anschließend ein Stoppcodon auf. Die weiteren vier Varianten zeigten die Sequenz TFLLPNT sowie eine



Frameshift Mutation auf. In der Sequenzanalyse der fünften Selektionsrunde zeigten drei Varianten die Sequenz TMPGMD. Ebenfalls drei Varianten hatten nach der Sequenz AY ein Stoppcodon und zwei Varianten hatten die Sequenz TQLLSGAVV sowie eine Frameshift Mutation. Keine der in den Sequenzanalysen ermittelten Sequenzen zeigte Homologien zu dem 13 Aminosäuren langen Epitop DGS LGDIEPYDSS, welches von dem anti-Sendai Antikörper spezifisch gebunden wird. Fast alle der Sequenzen nach den Selektionsrunden 3, 4 und 5 wurden in mehr als einer Variante gefunden, jedoch trat keine Sequenz in mehr als einer Selektionsrunde auf.

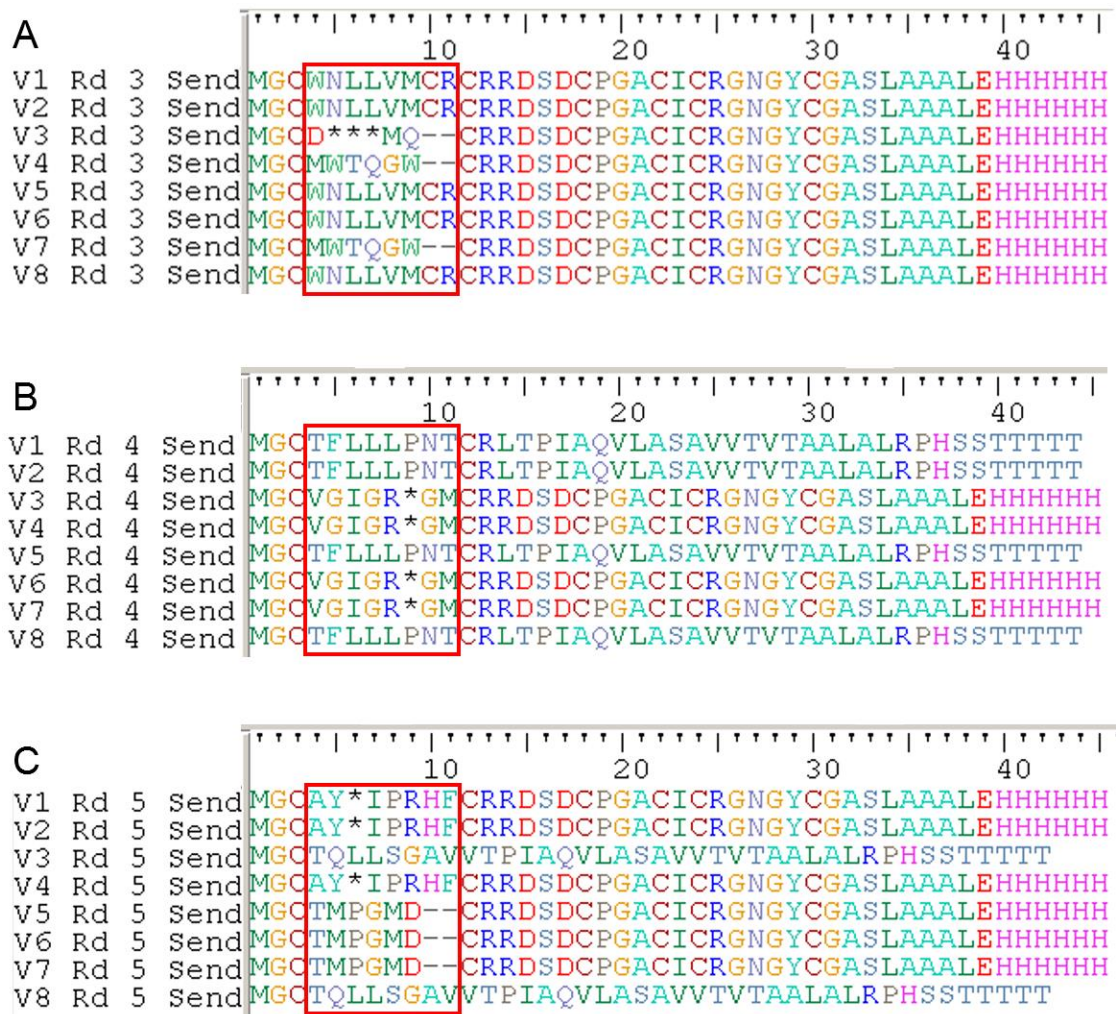


Abbildung 4.24: Sequenzen von je 8 Varianten nach Selektion auf Bindung des anti-Sendai-Antikörpers. A: Sequenzen der 3. Selektionsrunde; B: Sequenzen der 4. Selektionsrunde; C: Sequenzen der 5. Selektionsrunde; Stern: Stoppcodon; die rote Markierung zeigt den relevanten Bereich der Bibliothek.



---

#### 4.4.5 Diskussion

Nachdem das HaloTag DNA *display* erfolgreich etabliert werden konnte (4.3), wurde im letzten Abschnitt dieser Arbeit untersucht, ob das System zur Selektion von Peptiden mit spezifischen Bindungseigenschaften über mehrere Selektionsrunden geeignet ist. Hierzu wurde das neuentwickelte System zur Selektion einer randomisierten Peptidbibliothek eingesetzt. Basierend auf der  $\Delta$ S-GFP-HaloTag-MP DNA-Matrize, wurde eine Bibliothek generiert, die für eine 6, 8 bzw. 10 Aminosäuren lange randomisierte Peptidsequenz kodiert (4.4.1). Die Bibliothek wurde in insgesamt vier Selektionsrunden auf Bindung des anti-myc-Antikörpers selektiert (4.4.2). Im Anschluss wurden zwölf Varianten mittels *bead-ELISA* auf ihrer Bindungseigenschaften gegenüber dem anti-myc-Antikörper untersucht. Zwei der untersuchten Varianten zeigten ein sehr starkes Signal im *Bead-ELISA*, was auf eine spezifische Bindung des selektierten HaloTag-Fusionsproteins hindeutet. Durch eine Sequenzanalyse stellte sich jedoch heraus, dass diese beiden HaloTag-Fusionsproteine das myc-Epitop beinhalten und sequenzidentisch mit der, in den vorangegangenen Mischungsexperimenten verwendeten  $\Delta$ S-GFP-HaloTag-myc Variante sind (4.4.3). Eine zufällige Anreicherung der  $\Delta$ S-GFP-HaloTag-myc Variante kann durch die NNS Kodierung der HaloTag-MP-Bibliothek ausgeschlossen werden. Das Auffinden der  $\Delta$ S-GFP-HaloTag-myc Variante nach Selektion der HaloTag-MP-Bibliothek lässt sich nur durch eine Verunreinigung erklären, die entweder bereits in der HaloTag-MP-Bibliothek vorliegt oder während des Selektionsprozesses stattgefunden hat. Um eine Verunreinigung der Bibliothek ausschließen zu können, wurde diese neu erzeugt. Hierbei wurde das isolierte Plasmid einer Einzelkolonie der MP-Variante als DNA-Matrize verwendet. Es wurden erneut vier Selektionsrunden auf Bindung des anti-myc-Antikörpers mittels HaloTag DNA *display* durchgeführt. Eine PCR Analyse der Bibliothek sowie der selektierten Bibliothek nach der dritten und vierten Selektionsrunde mit MP- sowie myc-spezifischen Primer ließ auf eine erneute Kontamination der Bibliothek mit der myc-Variante schließen (Abbildung 4.18). Hierbei konnte bereits mit der Ausgangsbibliothek als DNA-Matrize ein PCR-Produkt der entsprechenden Größe in geringen Mengen generiert werden. Woher diese Kontamination kommen könnte ist weiterhin unklar, da neben dem pET22- $\Delta$ S-GFP-HaloTag-MP Vektor, der als Matrizen-DNA diente, auch Puffer und Primer-Verdünnungen neu hergestellt wurden. Eine Sequenzanalyse der neuen HaloTag-MP Bibliothek um die Kontamination final zu bestätigen

---

wurde nicht durchgeführt. Das Wiederauffinden der HaloTag-myc-Variante nach der vierten Selektionsrunde der HaloTag-MP-Bibliothek zeigt jedoch, dass der Selektionsprozess erfolgreich ist, und Varianten mit spezifischen Bindungseigenschaften aus einem Pool angereichert werden können. Allerdings bleibt weiterhin unbekannt in welchem Maße die Bibliothek mit der myc-Variante kontaminiert war. Daher kann auch keine Aussage über den Selektionserfolg getroffen werden.

Die Selektion der HaloTag-MP-Bibliothek gegen den anti-myc-Antikörper konnte aufgrund der Verunreinigung mit der  $\Delta$ S-GFP-HaloTag-myc-Variante nicht erfolgreich durchgeführt werden. Um eine erneute Kontamination ausschließen zu können, wurde ein neues Zielprotein gewählt, für welches noch kein HaloTag-Fusionsprotein mit spezifischen Bindungseigenschaften existiert. In den vorangegangenen Mischungsexperimenten erwies sich das Selektionsverfahren, bei dem ein Antikörper als Zielprotein über einen sekundären Antikörper auf der Oberfläche von *microbeads* immobilisiert wurde, als erfolgreich (4.3.3 und 4.3.4). Um dieses Selektionsverfahren weitgehend beibehalten zu können, wurde als neues Zielprotein der anti-Sendai-Antikörper gewählt. Da dieser über einen längeren Zeitraum gelagert wurde, wurde er zunächst auf seine Funktionalität hin getestet. Durch Western-Blot Analyse konnte die Funktionalität des anti-Sendai-Antikörpers bestätigt werden (Abbildung 4.19). Die Selektion der HaloTag-MP-Bibliothek auf Bindung des anti-Sendai-Antikörpers wurde über insgesamt fünf Selektionsrunden durchgeführt. Im Anschluss wurden zehn Varianten mittels *Bead-ELISA* auf ihre Bindungseigenschaften hin untersucht (Abbildung 4.20). Eine spezifische Bindung an den anti-Sendai-Antikörper konnte hierbei für keine der selektierten Varianten gezeigt werden. Da jedoch keine Positivkontrolle vorhanden war, kann dies nicht eindeutig nachgewiesen werden. So besteht die Möglichkeit, dass der *Bead-ELISA* in diesem Fall nicht funktioniert hat. Die für den *Bead-ELISA* verwendete zellfreie Proteinexpression der HaloTag-Fusionsproteine ist stark von der Qualität der eingesetzten Plasmid-DNA abhängig, da Verunreinigungen diesen Prozess stark negativ beeinflussen können (Kai *et al.*, 2012). Dieser Effekt kann auch in dem vorangegangenen *Bead-ELISA* zur Untersuchung der anti-myc-Antikörper Bindung beobachtet werden (Abbildung 4.20). Die Sequenzanalysen der Varianten 3 und 12 haben gezeigt, dass sie sequenzidentisch mit der als Positivkontrolle, eingesetzten HaloTag-myc-Variante sind. Trotzdem ist das Signal der Varianten 3 und 12 im *Bead-ELISA* circa fünffach stärker als das der Positivkontrolle. Dies ist vermutlich auf die Qualität und Reinheit der zur zellfreien

---

Proteinexpression eingesetzten Plasmid-DNA zurückzuführen. Um eine spezifische Bindung der selektierten HaloTag-MP-Variante an den anti-Sendai-Antikörper ausschließen zu können, wäre demnach eine Positivkontrolle notwendig. Auf die Klonierung einer HaloTag-Sendai-Variante, die anstelle des myc-Epitops das 13 Aminosäuren lange Sendai-Epitop beinhaltet, wurde jedoch aus zeitlichen Gründen verzichtet.

Zur weiteren Untersuchung der selektierten HaloTag-MP-Varianten wurden je acht Varianten der Selektionsrunden 3, 4 und 5 sequenziert (Abbildung 4.24). Hierbei zeigte keine der gefundenen Sequenzen Homologien der 13 Aminosäuren langen Sequenz des Sendai-Epitops. Eine spezifische Bindung dieser HaloTag-MP-Varianten an den anti-Sendai-Antikörper ist daher nicht sehr wahrscheinlich. Auffällig ist, dass fast jede Sequenz in mehr als einer Variante gefunden wurde. Diese Tatsache ließe sich durch die folgenden Ursachen erklären. Erstens: Die HaloTag-MP-Varianten binden spezifisch an den anti-Sendai-Antikörper. Das Paratop des Antikörpers stellt hierbei jedoch nicht die Bindestelle des Fusionsproteins dar, sondern die Bindung erfolgt an eine andere Antikörperregion. Zweitens: Die HaloTag-MP-Varianten binden unspezifisch an den anti-Sendai-Antikörper. Eine unspezifische Bindung lässt sich durch das Vorhandensein der vielen hydrophoben Aminosäuren in den Varianten erklären. Gleichzeitig war der zur Selektion verwendete anti-Sendai-Antikörper sehr alt. Die lange Lagerung könnte eine teilweise Denaturierung des Antikörpers bewirkt haben, was die Bindung der HaloTag-MP-Fusionsproteine über unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen begünstigen würde. Drittens: Die HaloTag-MP-Varianten binden den anti-Sendai-Antikörper nicht. Eine Anreicherung einzelner HaloTag-MP-Sequenzen ließe sich in diesem Fall durch eine verbesserte PCR-Amplifikation dieser Varianten erklären. Obwohl fast jede Sequenz mehrfach vorlag, wurde keine Sequenz in mehr als einer Selektionsrunde gefunden. Diese Tatsache deutet eher auf eine unspezifische Wechselwirkung der HaloTag-MP-Fusionsproteine mit dem anti-Sendai-Antikörper hin.

Die dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse lassen keine abschließende Beurteilung über die Eignung des HaloTag-DNA-*displays* zur Selektion von randomisierten Peptidbibliotheken auf Bindungseigenschaften zu. Hierzu wäre eine Sequenzanalyse der einzelnen Selektionsrunden in größerem Umfang notwendig. Zudem wäre die Wiederholung der Selektion mit einem besser geeigneten Zielprotein zu empfehlen. Die vergleichsweise guten Anreicherungsraten, die in dem Mischungsexperiment erzielt wurden, lassen jedoch den Schluss zu, dass das HaloTag-DNA-

---

*display* grundsätzlich zur Selektion von randomisierten Peptidbibliotheken auf Bindungseigenschaften geeignet ist.

## Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte ein neuartiges Verfahren zur Genotyp-Phänotyp-Kopplung etabliert werden, bei dem das zu präsentierende Polypeptid direkt oder über Microbeads mit dem kodierenden DNA Molekül verknüpft ist. Dies wurde unter Verwendung der HaloTag® Technologie erfolgreich umgesetzt, wobei sich die direkte Verknüpfung von Polypeptid und kodierendem DNA Molekül als zielführend erwies. Bei dem als HaloTag®-DNA-*display* bezeichneten Verfahren wird zunächst eine HaloLink® Bindungsgruppe über modifizierte PCR Primer in die Matrizen DNA eingebaut, welche für ein Fusionsprotein aus dem HaloTag®-Bindeprotein und dem zu präsentierenden Peptid kodiert. Nach Expression können die neusynthetisierten HaloTag®-Fusionsproteine die Bindungsgruppe der DNA-Matrize binden, wodurch kovalente DNA-Protein-Komplexe entstehen. Die Ausbildung dieser DNA-Protein-Komplexe konnte durch Mischen zweier unterschiedlicher Komplexe und Affinitätsselektion einer der Varianten nachgewiesen werden. In einem weiteren Mischungsexperiment konnte durch die Anreicherung eines Genotyps, aus einem Gemisch zweier Genotyp Varianten, eine Genotyp-Phänotyp-Kopplung, also die Kopplung des Fusionsproteins mit dem kodierenden DNA Molekül nachgewiesen werden. Hierzu wurden die DNA-Matrizen Moleküle in Wasser-in-Öl-Emulsion exprimiert, wobei die Konzentration an DNA-Matrize so gewählt wurde, dass statistisch nur ein DNA-Molekül pro Kompartiment vorliegt. Weiter konnte eine vollrandomisierte Peptidbibliothek erstellt werden, die in Modellexperimenten zur Anreicherung von Zielprotein bindenden Peptidsequenzen eingesetzt wurde. Hierbei wurden vier bis fünf aufeinanderfolgende Selektionsrunden auf Bindung eines immobilisierten Zielproteins durchgeführt und einzelne Variante im Anschluss analysiert. Durch diese Experimente konnte die Praxistauglichkeit des HaloTag®-DNA-*displays* bestätigt werden.

---

## 5 Literaturverzeichnis

---

- Baranauskas, A., Paliksa, S., Alzbutas, G., Vaitkevicius, M., Lubiene, J., Letukiene, V., Burinskas, S., Sasnauskas, G., and Skirgaila, R. (2012). Generation and characterization of new highly thermostable and processive M-MuLV reverse transcriptase variants. *Protein Eng Des Sel* **25**, 657-668.
- Baranov, V. I., und Spirin, A. S. (1993). Gene expression in cell-free system on preparative scale. *Methods Enzymol* **217**, 123-142.
- Becker, S., Schmoldt, H. U., Adams, T. M., Wilhelm, S., and Kolmar, H. (2004). Ultra-high-throughput screening based on cell-surface display and fluorescence-activated cell sorting for the identification of novel biocatalysts. *Curr Opin Biotechnol* **15**, 323-329.
- Bencurova, E., Pulzova, L., Flachbartova, Z., und Bhide, M. (2015). A rapid and simple pipeline for synthesis of mRNA-ribosome-VH complexes used in single-domain antibody ribosome display. *Mol Biosyst*.
- Bernath, K., Hai, M., Mastrobattista, E., Griffiths, A. D., Magdassi, S., und Tawfik, D. S. (2004). In vitro compartmentalization by double emulsions: sorting and gene enrichment by fluorescence activated cell sorting. *Anal Biochem* **325**, 151-157.
- Bernath, K., Magdassi, S., und Tawfik, D. S. (2005). Directed evolution of protein inhibitors of DNA-nucleases by in vitro compartmentalization (IVC) and nano-droplet delivery. *J Mol Biol* **345**, 1015-1026.
- Bertschinger, J., Grabulovski, D., und Neri, D. (2007). Selection of single domain binding proteins by covalent DNA display. *Protein Eng Des Sel* **20**, 57-68.
- Bertschinger, J., und Neri, D. (2004). Covalent DNA display as a novel tool for directed evolution of proteins in vitro. *Protein Eng Des Sel* **17**, 699-707.
- Binz, H. K., Stumpp, M. T., Forrer, P., Amstutz, P., und Pluckthun, A. (2003). Designing repeat proteins: well-expressed, soluble and stable proteins from combinatorial libraries of consensus ankyrin repeat proteins. *J Mol Biol* **332**, 489-503.
- Biyani, M., Husimi, Y., und Nemoto, N. (2006). Solid-phase translation and RNA-protein fusion: a novel approach for folding quality control and direct immobilization of proteins using anchored mRNA. *Nucleic Acids Res* **34**, e140.
- Boder, E. T., und Wittrup, K. D. (1997). Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol* **15**, 553-557.
- Borsook, H. (1950). Protein turnover and incorporation of labeled amino acids into tissue proteins in vivo and in vitro. *Physiol Rev* **30**, 206-219.
- Braun, B., und Paschke, M. (2006). Page Display auf neuen Wegen. . *BIOspektrum*, 381-383.
- Charbit, A., Boulain, J. C., Ryter, A., und Hofnung, M. (1986). Probing the topology of a bacterial membrane protein by genetic insertion of a foreign epitope; expression at the cell surface. *EMBO J* **5**, 3029-3037.
- Chen, L., MacMillan, A. M., Chang, W., Ezaz-Nikpay, K., Lane, W. S., und Verdine, G. L. (1991). Direct identification of the active-site nucleophile in a DNA (cytosine-5)-methyltransferase. *Biochemistry* **30**, 11018-11025.
- Cohen, H. M., Tawfik, D. S., und Griffiths, A. D. (2004). Altering the sequence specificity of HaeIII methyltransferase by directed evolution using in vitro compartmentalization. *Protein Eng Des Sel* **17**, 3-11.

- Cong, M. (2012). HaloTag(R) Platform: From Proteomics to Cellular Analysis and Animal Imaging. *Curr Chem Genomics* 6, 6-7.
- Craig, D., Howell, M. T., Gibbs, C. L., Hunt, T., und Jackson, R. J. (1992). Plasmid cDNA-directed protein synthesis in a coupled eukaryotic in vitro transcription-translation system. *Nucleic Acids Res* 20, 4987-4995.
- Darwin, C. R. (1859). On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life.
- Diamante, L., Gatti-Lafranconi, P., Schaerli, Y., und Hollfelder, F. (2013). In vitro affinity screening of protein and peptide binders by megavalent bead surface display. *Protein Eng Des Sel* 26, 713-724.
- Diehl, F., Li, M., He, Y., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., und Dressman, D. (2006). BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. *Nat Meth* 3, 551-559.
- Doi, N., Kumadaki, S., Oishi, Y., Matsumura, N., und Yanagawa, H. (2004). In vitro selection of restriction endonucleases by in vitro compartmentalization. *Nucleic Acids Res* 32, e95.
- Doi, N., Yamakawa, N., Matsumoto, H., Yamamoto, Y., Nagano, T., Matsumura, N., Horisawa, K., und Yanagawa, H. (2012). DNA display selection of peptide ligands for a full-length human G protein-coupled receptor on CHO-K1 cells. *PLoS One* 7, e30084.
- Doi, N., und Yanagawa, H. (1999). STABLE: protein-DNA fusion system for screening of combinatorial protein libraries in vitro. *FEBS Lett* 457, 227-230.
- Einberger, H., Mertz, R., Hofschneider, P. H., und Neubert, W. J. (1990). Purification, renaturation, and reconstituted protein kinase activity of the Sendai virus large (L) protein: L protein phosphorylates the NP and P proteins in vitro. *J Virol* 64, 4274-4280.
- Ellington, A. D., und Szostak, J. W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346, 818-822.
- Encell, L. P., Friedman Ohana, R., Zimmerman, K., Otto, P., Vidugiris, G., Wood, M. G., Los, G. V., McDougall, M. G., Zimprich, C., Karassina, N., *et al.* (2012). Development of a dehalogenase-based protein fusion tag capable of rapid, selective and covalent attachment to customizable ligands. *Curr Chem Genomics* 6, 55-71.
- French, C. S., und Milner, H. W. (1955). [9] Disintegration of bacteria and small particles by high-pressure extrusion. In *Methods in Enzymology* (Academic Press), pp. 64-67.
- Gai, S. A., und Wittrup, K. D. (2007). Yeast surface display for protein engineering and characterization. *Curr Opin Struct Biol* 17, 467-473.
- Gamkrelidze, M., und Dabrowska, K. (2014). T4 bacteriophage as a phage display platform. *Arch Microbiol* 196, 473-479.
- Gan, R., Furuzawa, S., Kojima, T., Kanie, K., Kato, R., Okochi, M., Honda, H., und Nakano, H. (2010). Directed evolution of angiotensin II-inhibiting peptides using a microbead display. *J Biosci Bioeng* 109, 411-417.
- Gan, R., Yamanaka, Y., Kojima, T., und Nakano, H. (2008). Microbeads display of proteins using emulsion PCR and cell-free protein synthesis. *Biotechnol Prog* 24, 1107-1114.
- Gera, N., Hussain, M., und Rao, B. M. (2013). Protein selection using yeast surface display. *Methods* 60, 15-26.
- Ghadessy, F. J., Ong, J. L., und Holliger, P. (2001). Directed evolution of polymerase function by compartmentalized self-replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4552-4557.

- Ghadessy, F. J., Ramsay, N., Boudsocq, F., Loakes, D., Brown, A., Iwai, S., Vaisman, A., Woodgate, R., und Holliger, P. (2004). Generic expansion of the substrate spectrum of a DNA polymerase by directed evolution. *Nat Biotechnol* 22, 755-759.
- Gold, L. M., und Schweiger, M. (1969). Synthesis of phage-specific alpha- and beta-glucosyl transferases directed by T-even DNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 62, 892-898.
- Haberstock, S., Roos, C., Hoevels, Y., Dotsch, V., Schnapp, G., Pautsch, A., und Bernhard, F. (2012). A systematic approach to increase the efficiency of membrane protein production in cell-free expression systems. *Protein Expr Purif* 82, 308-316.
- Hanes, J., Jermutus, L., Weber-Bornhauser, S., Bosshard, H. R., und Plückthun, A. (1998). Ribosome display efficiently selects and evolves high-affinity antibodies in vitro from immune libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14130-14135.
- Hanes, J., und Plückthun, A. (1997). In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4937-4942.
- Hanes, J., Schaffitzel, C., Knappik, A., und Plückthun, A. (2000). Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display. *Nat Biotechnol* 18, 1287-1292.
- He, M., und Taussig, M. J. (1997). Antibody-ribosome-mRNA (ARM) complexes as efficient selection particles for in vitro display and evolution of antibody combining sites. *Nucleic Acids Res* 25, 5132-5134.
- Hirokawa, G., Demeshkina, N., Iwakura, N., Kaji, H., und Kaji, A. (2006). The ribosome-recycling step: consensus or controversy? *Trends Biochem Sci* 31, 143-149.
- Hong, H., Benink, H. A., Zhang, Y., Yang, Y., Uyeda, H. T., Engle, J. W., Severin, G. W., McDougall, M. G., Barnhart, T. E., Klaubert, D. H., *et al.* (2011). HaloTag: a novel reporter gene for positron emission tomography. *Am J Transl Res* 3, 392-403.
- Hörber, S. (2012). Genotyp-Phänotyp-Kopplung über indirekte Konjugation von Proteinen an ihren eigenen Nukleinsäuresequenz-Abschnitt. Diplomarbeit.
- Houlihan, G., Gatti-Lafronconi, P., Kaltenbach, M., Lowe, D., und Hollfelder, F. (2014). An experimental framework for improved selection of binding proteins using SNAP display. *J Immunol Methods* 405, 47-56.
- Hu, D., Tateno, H., und Hirabayashi, J. (2014). Directed evolution of lectins by an improved error-prone PCR and ribosome display method. *Methods Mol Biol* 1200, 527-538.
- Jackel, C., Kast, P., und Hilvert, D. (2008). Protein design by directed evolution. *Annu Rev Biophys* 37, 153-173.
- Janssen, D. B. (2004). Evolving haloalkane dehalogenases. *Curr Opin Chem Biol* 8, 150-159.
- Kai, L., Dotsch, V., Kaldenhoff, R., und Bernhard, F. (2013). Artificial environments for the co-translational stabilization of cell-free expressed proteins. *PLoS One* 8, e56637.
- Kai, L., Roos, C., Haberstock, S., Proverbio, D., Ma, Y., Junge, F., Karbyshev, M., Dotsch, V., und Bernhard, F. (2012). Systems for the cell-free synthesis of proteins. *Methods Mol Biol* 800, 201-225.
- Kaltenbach, M., und Hollfelder, F. (2012). SNAP display: in vitro protein evolution in microdroplets. *Methods Mol Biol* 805, 101-111.
- Kaltenbach, M., Stein, V., und Hollfelder, F. (2011). SNAP dendrimers: multivalent protein display on dendrimer-like DNA for directed evolution. *Chembiochem* 12, 2208-2216.



- Keppler, A., Gendreizig, S., Gronemeyer, T., Pick, H., Vogel, H., und Johnsson, K. (2003). A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nat Biotechnol* *21*, 86-89.
- Keppler, A., Kindermann, M., Gendreizig, S., Pick, H., Vogel, H., und Johnsson, K. (2004). Labeling of fusion proteins of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase with small molecules in vivo and in vitro. *Methods* *32*, 437-444.
- Kigawa, T., Yabuki, T., Yoshida, Y., Tsutsui, M., Ito, Y., Shibata, T., und Yokoyama, S. (1999). Cell-free production and stable-isotope labeling of milligram quantities of proteins. *FEBS Lett* *442*, 15-19.
- Klaholz, B. P. (2011). Molecular recognition und catalysis in translation termination complexes. *Trends Biochem Sci* *36*, 282-292.
- Kralicek, A. V., Radjainia, M., Mohamad Ali, N. A., Carraher, C., Newcomb, R. D., und Mitra, A. K. (2011). A PCR-directed cell-free approach to optimize protein expression using diverse fusion tags. *Protein Expr Purif* *80*, 117-124.
- Kummer, L., Parizek, P., Rube, P., Millgramm, B., Prinz, A., Mittl, P. R., Kaufholz, M., Zimmermann, B., Herberg, F. W., und Pluckthun, A. (2012). Structural and functional analysis of phosphorylation-specific binders of the kinase ERK from designed ankyrin repeat protein libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, E2248-2257.
- Kung, H. F., Redfield, B., Treadwell, B. V., Eskin, B., Spears, C., und Weissbach, H. (1977). DNA-directed in vitro synthesis of beta-galactosidase. Studies with purified factors. *J Biol Chem* *252*, 6889-6894.
- Kurz, M., Gu, K., und Lohse, P. A. (2000). Psoralen photo-crosslinked mRNA-puromycin conjugates: a novel template for the rapid and facile preparation of mRNA-protein fusions. *Nucleic Acids Res* *28*, E83.
- Lang, F. J. (2008). Etablierung eines ribosomalen Displays unter Verwendung verschiedener Genotyp-Phänotyp Kopplungsstrategien. Diplomarbeit.
- Lederman, M., und Zubay, G. (1967). DNA-directed peptide synthesis. 1. A comparison of T2 and Escherichia coli DNA-directed peptide synthesis in two cell-free systems. *Biochim Biophys Acta* *149*, 253-258.
- Lee, S. Y., Choi, J. H., und Xu, Z. (2003). Microbial cell-surface display. *Trends Biotechnol* *21*, 45-52.
- Leemhuis, H., Stein, V., Griffiths, A. D., und Hollfelder, F. (2005). New genotype-phenotype linkages for directed evolution of functional proteins. *Curr Opin Struct Biol* *15*, 472-478.
- Levy, M., und Ellington, A. D. (2008). Directed evolution of streptavidin variants using in vitro compartmentalization. *Chem Biol* *15*, 979-989.
- Littlefield, J. W., Keller, E. B., Gross, J., und Zamecnik, P. C. (1955). Studies on cytoplasmic ribonucleoprotein particles from the liver of the rat. *J Biol Chem* *217*, 111-123.
- Liu, R., Barrick, J. E., Szostak, J. W., und Roberts, R. W. (2000). Optimized synthesis of RNA-protein fusions for in vitro protein selection. *Methods Enzymol* *318*, 268-293.
- Löfblom, J. (2011). Bacterial display in combinatorial protein engineering. *Biotechnol J* *6*, 1115-1129.
- Los, G. V., Encell, L. P., McDougall, M. G., Hartzell, D. D., Karassina, N., Zimprich, C., Wood, M. G., Learish, R., Ohana, R. F., Urh, M., *et al.* (2008). HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS Chem Biol* *3*, 373-382.



- Lu, W. C., und Ellington, A. D. (2012). In vitro selection of proteins via emulsion compartments. *Methods*.
- Marcus, A., Efron, D., und Weeks, D. P. (1974). The wheat embryo cell-free system. *Methods Enzymol* *30*, 749-754.
- Mastrobattista, E., Taly, V., Chanudet, E., Treacy, P., Kelly, B. T., und Griffiths, A. D. (2005). High-throughput screening of enzyme libraries: in vitro evolution of a beta-galactosidase by fluorescence-activated sorting of double emulsions. *Chem Biol* *12*, 1291-1300.
- Mattheakis, L. C., Bhatt, R. R., und Dower, W. J. (1994). An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 9022-9026.
- Miyamoto-Sato, E., Takashima, H., Fuse, S., Sue, K., Ishizaka, M., Tateyama, S., Horisawa, K., Sawasaki, T., Endo, Y., und Yanagawa, H. (2003). Highly stable and efficient mRNA templates for mRNA-protein fusions and C-terminally labeled proteins. *Nucleic Acids Res* *31*, e78.
- Naimuddin, M., Kobayashi, S., Tsutsui, C., Machida, M., Nemoto, N., Sakai, T., und Kubo, T. (2011). Directed evolution of a three-finger neurotoxin by using cDNA display yields antagonists as well as agonists of interleukin-6 receptor signaling. *Mol Brain* *4*, 2.
- Nemoto, N., Miyamoto-Sato, E., Husimi, Y., und Yanagawa, H. (1997). In vitro virus: bonding of mRNA bearing puromycin at the 3'-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome in vitro. *FEBS Lett* *414*, 405-408.
- Nemoto, N., Tsutsui, C., Yamaguchi, J., Ueno, S., Machida, M., Kobayashi, T., und Sakai, T. (2012). Antagonistic effect of disulfide-rich peptide aptamers selected by cDNA display on interleukin-6-dependent cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* *421*, 129-133.
- Nevin, D. E., und Pratt, J. M. (1991). A coupled in vitro transcription-translation system for the exclusive synthesis of polypeptides expressed from the T7 promoter. *FEBS Lett* *291*, 259-263.
- Nirenberg, M. W., und Matthaei, J. H. (1961). The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* *47*, 1588-1602.
- Nord, O., Uhlen, M., und Nygren, P. A. (2003). Microbead display of proteins by cell-free expression of anchored DNA. *J Biotechnol* *106*, 1-13.
- Ohana, R. F., Hurst, R., Vidugiriene, J., Slater, M. R., Wood, K. V., und Urh, M. (2011). HaloTag-based purification of functional human kinases from mammalian cells. *Protein Expr Purif* *76*, 154-164.
- Olson, C. A., Nie, J., Diep, J., Al-Shyoukh, I., Takahashi, T. T., Al-Mawsawi, L. Q., Bolin, J. M., Elwell, A. L., Swanson, S., Stewart, R., *et al.* (2012). Single-Round, Multiplexed Antibody Mimetic Design through mRNA Display. *Angew Chem Int Ed Engl*.
- Paul, S., Stang, A., Lennartz, K., Tenbusch, M., und Uberla, K. (2013). Selection of a T7 promoter mutant with enhanced in vitro activity by a novel multi-copy bead display approach for in vitro evolution. *Nucleic Acids Res* *41*, e29.
- Pelham, H. R., und Jackson, R. J. (1976). An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem* *67*, 247-256.

- Perruchini, C., Pecorari, F., Bourgeois, J. P., Duyckaerts, C., Rougeon, F., und Lafaye, P. (2009). Llama VHH antibody fragments against GFAP: better diffusion in fixed tissues than classical monoclonal antibodies. *Acta Neuropathol* 118, 685-695.
- Pluckthun, A. (2012). Ribosome display: a perspective. *Methods Mol Biol* 805, 3-28.
- Pries, F., van den Wijngaard, A. J., Bos, R., Pentenga, M., und Janssen, D. B. (1994). The role of spontaneous cap domain mutations in haloalkane dehalogenase specificity and evolution. *J Biol Chem* 269, 17490-17494.
- Quinn, D. J., Cunningham, S., Walker, B., und Scott, C. J. (2008). Activity-based selection of a proteolytic species using ribosome display. *Biochem Biophys Res Commun* 370, 77-81.
- Rath, P., Demange, P., Saurel, O., Tropis, M., Daffe, M., Dotsch, V., Ghazi, A., Bernhard, F., und Milon, A. (2011). Functional expression of the PorAH channel from *Corynebacterium glutamicum* in cell-free expression systems: implications for the role of the naturally occurring mycolic acid modification. *J Biol Chem* 286, 32525-32532.
- Ren, Z., und Black, L. W. (1998). Phage T4 SOC and HOC display of biologically active, full-length proteins on the viral capsid. *Gene* 215, 439-444.
- Roberts, B. E., und Paterson, B. M. (1973). Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 2330-2334.
- Roberts, R. W., und Szostak, J. W. (1997). RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12297-12302.
- Rodi, D. J., und Makowski, L. (1999). Phage-display technology—finding a needle in a vast molecular haystack. *Curr Opin Biotechnol* 10, 87-93.
- Ryabova, L. A., Vinokurov, L. M., Shekhovtsova, E. A., Alakhov, Y. B., und Spirin, A. S. (1995). Acetyl phosphate as an energy source for bacterial cell-free translation systems. *Anal Biochem* 226, 184-186.
- Santini, C., Brennan, D., Mennuni, C., Hoess, R. H., Nicosia, A., Cortese, R., und Luzzago, A. (1998). Efficient display of an HCV cDNA expression library as C-terminal fusion to the capsid protein D of bacteriophage lambda. *J Mol Biol* 282, 125-135.
- Schachtschabel, D., und Zillig, W. (1959). [Investigations on the biosynthesis of proteins. I. Synthesis of radiocarbon labeled amino acids in proteins of cell free nucleoprotein-enzyme-system of *Escherichia coli*]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 314, 262-275.
- Schilling, J., Schoppe, J., und Pluckthun, A. (2014). From DARPin to LoopDARPin: novel LoopDARPin design allows the selection of low picomolar binders in a single round of ribosome display. *J Mol Biol* 426, 691-721.
- Schneider, B., Junge, F., Shirokov, V. A., Durst, F., Schwarz, D., Dotsch, V., und Bernhard, F. (2010). Membrane protein expression in cell-free systems. *Methods Mol Biol* 601, 165-186.
- Schroeder, G. K., Lad, C., Wyman, P., Williams, N. H., und Wolfenden, R. (2006). The time required for water attack at the phosphorus atom of simple phosphodiester and of DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4052-4055.
- Schwarz, D., Klammt, C., Koglin, A., Lohr, F., Schneider, B., Dotsch, V., und Bernhard, F. (2007). Preparative scale cell-free expression systems: new tools for the large scale preparation of integral membrane proteins for functional and structural studies. *Methods* 41, 355-369.

- Sepp, A., Tawfik, D. S., und Griffiths, A. D. (2002). Microbead display by in vitro compartmentalisation: selection for binding using flow cytometry. *FEBS Lett* 532, 455-458.
- Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., und Ueda, T. (2001). Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat Biotechnol* 19, 751-755.
- Shimizu, Y., Kanamori, T., und Ueda, T. (2005). Protein synthesis by pure translation systems. *Methods* 36, 299-304.
- Shimizu, Y., und Ueda, T. (2010). PURE technology. *Methods Mol Biol* 607, 11-21.
- Sidhu, S. S., Lowman, H. B., Cunningham, B. C., und Wells, J. A. (2000). Phage display for selection of novel binding peptides. *Methods Enzymol* 328, 333-363.
- Skirgaila, R., Pudzaitis, V., Paliksa, S., Vaitkevicius, M., und Janulaitis, A. (2013). Compartmentalization of destabilized enzyme-mRNA-ribosome complexes generated by ribosome display: a novel tool for the directed evolution of enzymes. *Protein Eng Des Sel* 26, 453-461.
- Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317.
- Smith, G. P., und Petrenko, V. A. (1997). Phage Display. *Chem Rev* 97, 391-410.
- Spirin, A. S., Baranov, V. I., Ryabova, L. A., Ovodov, S. Y., und Alakhov, Y. B. (1988). A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science* 242, 1162-1164.
- Spirin, A. S., und Swartz, J. R. (2008). Cell-Free Protein Synthesis Systems: Historical Landmarks, Classification, and General Methods. In *Cell-Free Protein Synthesis* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA), pp. 1-34.
- Stein, V., Sielaff, I., Johnsson, K., und Hollfelder, F. (2007). A covalent chemical genotype-phenotype linkage for in vitro protein evolution. *Chembiochem* 8, 2191-2194.
- Sumida, T., Doi, N., und Yanagawa, H. (2009). Bicistronic DNA display for in vitro selection of Fab fragments. *Nucleic Acids Res* 37, e147.
- Sumida, T., Yanagawa, H., und Doi, N. (2012). In vitro selection of fab fragments by mRNA display and gene-linking emulsion PCR. *J Nucleic Acids* 2012, 371379.
- Tabuchi, I., Soramoto, S., Suzuki, M., Nishigaki, K., Nemoto, N., und Husimi, Y. (2002). An Efficient Ligation Method in the Making of an in vitro Virus for in vitro Protein Evolution. *Biol Proced Online* 4, 49-54.
- Taniguchi, Y., und Kawakami, M. (2010). Application of HaloTag protein to covalent immobilization of recombinant proteins for single molecule force spectroscopy. *Langmuir* 26, 10433-10436.
- Tawfik, D. S., und Griffiths, A. D. (1998). Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nat Biotechnol* 16, 652-656.
- Traxlmayr, M. W., und Obinger, C. (2012). Directed evolution of proteins for increased stability and expression using yeast display. *Arch Biochem Biophys* 526, 174-180.
- Tuckey, C., Asahara, H., Zhou, Y., und Chong, S. (2014). Protein synthesis using a reconstituted cell-free system. *Curr Protoc Mol Biol* 108, 16.31.11-16.31.22.
- Tuerk, C., und Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249, 505-510.

- 
- Ueno, S., und Nemoto, N. (2012). cDNA display: rapid stabilization of mRNA display. *Methods Mol Biol* *805*, 113-135.
- Ueno, S., Yoshida, S., Mondal, A., Nishina, K., Koyama, M., Sakata, I., Miura, K., Hayashi, Y., Nemoto, N., Nishigaki, K., *et al.* (2012). In vitro selection of a peptide antagonist of growth hormone secretagogue receptor using cDNA display. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 11121-11126.
- Ullman, C. G., Frigotto, L., und Cooley, R. N. (2011). In vitro methods for peptide display and their applications. *Brief Funct Genomics* *10*, 125-134.
- van Bloois, E., Winter, R. T., Kolmar, H., und Fraaije, M. W. (2011). Decorating microbes: surface display of proteins on Escherichia coli. *Trends Biotechnol* *29*, 79-86.
- Williams, N. H., Takasaki, B., Wall, M., und Chin, J. (1999). Structure and Nuclease Activity of Simple Dinuclear Metal Complexes: Quantitative Dissection of the Role of Metal Ions. *Accounts of Chemical Research* *32*, 485-493.
- Winnick, T. (1950). Studies on the mechanism of protein synthesis in embryonic and tumor tissues. II. Inactivation of fetal rat liver homogenates by dialysis, and reactivation by the adenylic acid system. *Arch Biochem* *28*, 338-347.
- Wood, W. B., und Berg, P. (1962). The effect of enzymatically synthesized ribonucleic acid on amino acid incorporation by a soluble protein-ribosome system from Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* *48*, 94-104.
- Yabe, R., Suzuki, R., Kuno, A., Fujimoto, Z., Jigami, Y., und Hirabayashi, J. (2007). Tailoring a novel sialic acid-binding lectin from a ricin-B chain-like galactose-binding protein by natural evolution-mimicry. *J Biochem* *141*, 389-399.
- Yamaguchi, J., Naimuddin, M., Biyani, M., Sasaki, T., Machida, M., Kubo, T., Funatsu, T., Husimi, Y., und Nemoto, N. (2009). cDNA display: a novel screening method for functional disulfide-rich peptides by solid-phase synthesis and stabilization of mRNA-protein fusions. *Nucleic Acids Res* *37*, e108.
- Yau, K. Y., Dubuc, G., Li, S., Hirama, T., Mackenzie, C. R., Jermutus, L., Hall, J. C., und Tanha, J. (2005). Affinity maturation of a V(H)H by mutational hotspot randomization. *J Immunol Methods* *297*, 213-224.
- Yonezawa, M., Doi, N., Higashinakagawa, T., und Yanagawa, H. (2004). DNA display of biologically active proteins for in vitro protein selection. *J Biochem* *135*, 285-288.
- Yonezawa, M., Doi, N., Kawahashi, Y., Higashinakagawa, T., und Yanagawa, H. (2003). DNA display for in vitro selection of diverse peptide libraries. *Nucleic Acids Res* *31*, e118.
- Zhao, L., Ning, B., Bai, J., Chen, X., Peng, Y., Sun, S., Li, G., Fan, X., Liu, Y., Liu, J., *et al.* (2013). Selection of bisphenol A - single-chain antibodies from a non-immunized mouse library by ribosome display. *Anal Biochem*.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

Die verwendeten ein- und dreibuchstabigen Abkürzungen für Aminosäuren sowie alle verwendeten physikalischen Größen entsprechen der Konvention der *International Union for Biochemistry* (Liébecq 1992).

AcP	Acetylphosphat
Aga1p	$\alpha$ -Agglutinin Untereinheit 1 / <i><math>\alpha</math>-agglutinin anchoring subunit 1</i>
Aga2p	$\alpha$ -Agglutinin Untereinheit 2 / <i><math>\alpha</math>-agglutinin anchoring subunit 2</i>
AGT	O <sup>6</sup> -Alkylguanin-DNA Alkyltransferase
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BeSD	<i>bead surface display</i>
BG	O <sup>6</sup> -Benzylguanin
Bib	Bibliothek
bp	Basenpaar
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
cDNA	komplementäre DNA, <i>complementary DNA</i>
CECF	<i>continuous-exchange cell-free</i>
CFCF	<i>continuous-flow cell-free</i>
DARPs	<i>Designed Ankyrin Repeat Proteins</i>
DhaA	Haloalkan Dehalogenase aus <i>Rhodococcus rhodochrous</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dYT	<i>double Yeast Tryptone</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

---

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
emPCR	Emulsions PCR
F	5-Fluoro-2'-deoxycytidin
FAC	Fluoreszenz-aktivierte Zählen, <i>fluorescence activated counting</i>
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung, <i>fluorescence activated cell sorting</i>
Flc	Fluorescein
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein, <i>green fluorescent protein</i>
HRP	Meerrettichperoxydase, <i>horseradish peroxidase</i>
IgG	Immunglobulin G (gamma)
IMAC	Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IVC	<i>in vitro</i> Kompartimentierung, <i>in vitro compartmentalization</i>
IVTT	<i>in vitro</i> Transkriptions-/Translationssystem
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
M	Molekulargewicht (in g/mol)
M. <i>HaeIII</i>	DNA-Methyltransferase HaeIII Gen
MCoTI-II	<i>Momordica cochinchinensis</i> Trypsininhibitor II
min	Minute
MP	Miniprotein
mRNA	<i>messenger</i> RNA, Boten RNA
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NTPs	Nukleosidtriphosphate
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
ori	Replikationsursprung
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

---

---

PCR	Polymerasekettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
Peptidyl-tRNA	Peptidyltransfer-RNA
Pi	anorganisches Phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNPP	Para-Nitrophenylphosphat
PRM-Komplexe	Protein-Ribosom-mRNA-Komplexe
PURE	<i>protein synthesis using recombinant elements</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNasen	Ribonukleasen
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sGFP	<i>red shifted green fluorescent protein</i>
SOE-PCR	<i>splicing by overlap extension</i> PCR
STABLE	<i>streptavidin-biotin linkage in emulsion</i>
tRNA	Tyrosyl Transfer-RNA
U	Einheit, <i>Unit</i>
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Variante
v/v	Volumen pro Volumen
VHH	<i>variable chain of the heavy-chain of a heavy- chain antibody</i>
Vol	Volumen
w/v	Masse pro Volumen
wt	Wildtyp

---

## 7 Danksagung

---

In erster Linie möchte ich mich bei Prof. Dr. Harald Kolmar für die Bereitstellung des interessanten Themas, der Möglichkeit zur Fertigung dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe, die umfassende Betreuung und die wissenschaftlichen Diskussionen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Thiel danke ich ganz herzlich für die Übernahme des Korreferats.

Weiter danke ich Dr. Andreas Christmann für die stetige Betreuung, konstruktive Kritik und wissenschaftlichen Diskussionen. Bei Dr. Olga Avrutina möchte ich mich für die Hilfe und Unterstützung bei allen chemischen Fragestellungen bedanken. Barbara Diestelmann danke ich für die Hilfestellungen in allen bürokratischen Angelegenheiten.

Dr. Frank Bernhard und Lei Kai vom Institut für Biophysikalische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt danke ich für die nette und umfassende Unterstützung beim Aufbau eines zellfreien Expressionssystems sowie der Bereitstellung der hierfür benötigten Materialien und Protokolle.

Mein weiterer Dank gilt Stefanie Hörber, die mich im Rahmen ihrer Diplomarbeit maßgeblich beim Aufbau des zellfreien Expressionssystems unterstützt hat.

Der gesamten Arbeitsgruppe Kolmar danke ich für jegliche Hilfestellungen und die nette Arbeitsatmosphäre. Dabei gilt mein besonderer Dank Dr. Stefanie Heil, Dr. Michael Tomaszowski, Silke Steiger und Simone Bartl-Zimmermann für die fachliche und freundschaftliche Unterstützung während meiner gesamten Promotion und darüber hinaus.

Zudem möchte ich mich herzlich bei Dr. Stefanie Heil, Dr. Tobias Bauer und Stefanie Rück für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meinem Mann, die durch ihre Unterstützung maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. Ohne Euch wäre das alles nicht möglich gewesen.



---

## **8 Erklärungen**

---

### **8.1 Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Darmstadt, den

### **8.2 Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich bisher noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Darmstadt, den

---

## 9 Lebenslauf

---

Name:	Franziska Loggen, geb. Lang
Geburtsdatum:	07. Juli 1982
Geburtsort:	Frankfurt am Main
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet
Ausbildung:	
06/2002	Abitur am Georg-Christoph-Lichtenberg-Oberstufen-Gymnasium, Bruchköbel
10/2002 – 09/2008	Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt
08/2005 – 05/2006	Auslandsstudium an der University of Nebraska Lincoln
01/2008 – 09/2008	Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Harald Kolmar am Institut für organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt. Titel der Diplomarbeit: „Etablierung eines ribosomalen Displays unter Verwendung verschiedener Genotyp-Phänotyp Kopplungsstrategien“
01/2009 – 04/2012	Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dr. Harald Kolmar am Institut für organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt. Titel der Dissertation: „Über die Etablierung neuartiger Verfahren zur DNA vermittelten <i>in vitro</i> Genotyp-Phänotyp-Kopplung“

Franziska Loggen